

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología



**IDENTIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE LAS
PROTEÍNAS QUE
INTERACCIONAN CON SHOX Y
SHOX2**

Memoria para optar al grado de Doctor de la licenciada:

Verónica Barca Tierno

Directora de Tesis:

Dra. Karen Elise Heath



RATIFICACIÓN RAZONADA DE LA AUTORIZACIÓN DE DEFENSA DE LA TESIS DOCTORAL POR LA DIRECTORA DE TESIS

D^a Karen E. Heath, Investigadora del Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM)
del Hospital Universitario La Paz,

CERTIFICA,

Que Doña Verónica Barca Tierno ha realizado bajo mi dirección un trabajo de investigación de tesis doctoral que lleva por título: **“Identificación y caracterización de las proteínas que interaccionan con SHOX y SHOX2”**.

Revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación del mismo, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometida a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor por esta Universidad.

En Madrid, a 14 de Mayo de 2013

Fdo. Dra. Karen E. Heath
Directora de Tesis
Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM)
Hospital Universitario La Paz

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos

"In my end is my beginning"

Mary Queen of Scots

Parece ser que ha llegado el final, y echando la vista atrás parece mentira que por fin vaya ha acabar. Y que sería un final sin agradecimientos, verdad Miri...Así que llego el momento de agradecer a todas las personas que me han acompañado en este largo camino y que han hecho posible este trabajo.

En primer lugar agradecer enormemente a mi directora de tesis, Karen, primero por darme la oportunidad de formar parte del “Comando SHOX” pero sobre todo gracias por todo lo que he aprendido durante todos estos años, por tu constancia, por tu forma de transmitir la ciencia, por la ilusión que muestras cada día en el trabajo, por estos últimos meses y sobre todo gracias por haber sido tan cercana y por haber tenido una tan buena relación como la que tienes con cada uno de nosotros.

En segundo lugar, y no sin ser menos importante, a Ángel, porque siempre has estado ahí cuando te hemos necesitado pero sobre todo por tus correcciones, por tu ayuda en estos últimos meses, por tus ánimos y porque el HRM no sería lo mismo sin ti!

Y llego vuestro momento... a mis compañeras, que dejaron de ser compañeras para ser amigas (Alf ya sabes que eres una de ellas). No tengo palabras ni hojas suficientes para agradecerlos y deciros lo que habeis sido para mi en todos estos años. Empezaré por el final donde me veo invadiendo la mesa de Alberta con mis millones de matrascitos...y que va a ser de mí sin ti, sin verte cada día al otro lado de mi poyata, porque empezamos juntas este camino y ahora el mío llega al final. Un final que sin ti no habría sido posible, gracias Alb por haber estado siempre, en lo bueno y en lo malo, por haber estado cerca aun cuando estabas tan lejos de aquí.

Y al que sin duda va a ser el sucesor, el heredero del Y2H, Alfonso, gracias por haber sido un amigo, por haberme ayudado durante todos estos años, por tu paciencia en los últimos meses, por ser una de las “tres mellizas”, por los “pido no”, por las risas y los buenos momentos, porque ahora tenemos una, pero antes eramos cuatro en una misma poyata...y para ser cuatro me faltan dos...Patri y Miri.

Que voy a decir de ti Patri, no sabría ni como describir lo que has sido y eres para mí, porque cuando te fuiste sentí que me faltaba algo, echaba de menos las risas, las conversaciones, “Cultiva plaquea 100ul” y el verte cada mañana...ya ni Karen me mandaba callar!!!, pero llego Miri, y como quien no quiere la cosa empezó a sentarse en nuestro sitio, y empezaron las charlas en el metro del “SOX trío” (estabais en bucle), y el ser cuatro en una misma mesa, y el “alguien” que siempre nos la descolocaba.

Y a ti Miri solo puedo decirte GRACIAS por todo, porque hoy en parte estoy aquí por ti, por lo que me has enseñado, por tu paciencia en algunos momentos, por tu increíble

forma de ser, por tu apoyo, por las charlas, las risas, los lloros, el saber que siempre estabas ahí y porque sé que siempre lo estarás.

A Eva, porque siempre nos quedará Alicante..., por sus meriendas en la pisci, porque siempre tenías una sonrisa cuando necesitaba algo tuyo, porque tus niños son los mejor del mundo y porque eres genial y una gran amiga. Y sin Eva no hay Noe, al final el camino nos ha vuelto a juntar, y por suerte ahora te tengo cerca, porque me has ayudado mucho cuando lo he necesitado y porque nada sería igual sin que nos pusieses “firmes” de vez en cuando.

Y como no hablar del comando ACB, Olga, Ana y Silvia. Mi Olga, mi compañera de cálculos, mi amiga, la ilusión, la paciencia, la serenidad, la ternura y millones de cosas mas que te podría decir, porque la vida al final te dio lo que merecias, llegó la sobri!!!. A Anichuli, porque el labo no sería lo mismo sin ti, sin tus risas, porque llegaste y pronto te hiciste un hueco entre nosotros y ahora ya no puedes salir, ya no te dejo, quiero que siempre formes parte de mi vida. Y Silvia, que al principio no hablaba ni media, pero después hemos vivido tantos buenos momentos juntas que se me hace difícil imaginar que sería de nosotras sin que tú hubieses aparecido. Y me queda Sara, gracias porque has estado ahí cuando he tenido que contar contigo, por León, las cenas y los buenos momentos.

Gracias a todos, por tantísimos recuerdos, por las fiestas, los viajes, las despedidas, las resacas, la boda, kiwa, las quedadas, los hongos, las charlas interminables, los cars, las cenas...gracias por ser como sois y por haberme hechos fáciles, momentos difíciles, OS QUIERO.

Me queda gente por nombrar y que también han formado parte de estos maravillosos años. A Constanza, Blanca, Paloma, Jesús Molano, Pedro, Jair, Pablo, Nacho, Isa, todos los estudiantes, Christian, como no a Adela, por ser mi compañera bilingüe, a todos GRACIAS porque de una manera u otra habeis contribuido a que esto llegue al final. A toda la gente de citogenética, a labo de Juanan y a todos los que habeis conseguido ser la gran familia del INGEMM.

Pero fuera del laboratorio hay vida, sí, y no puedo cerrar este capítulo sin nombrar a mi familia, porque ellos son mi vida. A mis padres que han sufrido día a día mis malos momentos, han disfrutado con mis logros y me han levantado cuando caía. Hoy puedo decir que soy lo que soy gracias vosotros, pero me haría falta toda una eternidad para decir con palabras lo que significais para mí. Y que decir de mis hermanas, Miriam y Marta, que sin vosotras no soy nadie, habeis sido mis oidos para escucharme, mis ojos cuando no era capaz de ver por mí misma, gracias por haberme sacado una sonrisa cuando más la necesitaba. A mis abuelos, Justa y Domingo, que son las mejores personas del mundo, que dejaron de preocuparse por sus hijos para hacerlo por sus nietas y que darían

cualquier cosa por hacernos felices. Y por supuesto, a los que ya no están, os llevo en mi corazón. Os quiero muchísimo a todos.

Y como no a mis priminas, Marian, hemos vivido tanto tiempo juntas que podría leer veinte tesis más que sé que seguirías a mi lado, sé que nunca me vas a fallar, a Cristina y María, por las cenas de priminas, los viajes, las Navidades...Paula y Diego, y a mis tíos que tan orgullosos se van a sentir de mi, Mimin y Anabel, y Juan y Laura.

A mis amigas de Berlanga, Marian tu también estas aquí, por los viajes, las fiestas, los "No puedo quedar que tengo que hacer tesis", y sobre todo por tantísimos recuerdos con vosotras.

A Marien que sin duda ha sido junto con Alfonso, los que han sufrido en primera persona todos estos meses. Son tantos los paseos, las llamadas, las salidas, las entradas, los agobios... que no tengo como agradecerlo, así que tendremos que seguir viviendo buenos momentos juntas durante muchos años, gracias Enci por haberte cruzado en mi vida. Angélica para ti también hay, porque lo que ha unido León que no lo separe nadie, tengo la gran suerte de haber contado contigo y de que hoy se me llene la boca al decir que eres mi gran amiga.

Aunque te he dejado para el último no significa que no tuvieses que ir el primero, porque si los paper repartidos por toda la casa no han acabado con nuestra relación creo que ya nada va a acabar con ella. Para tí va otro GRACIAS, porque un día me dijiste que no se habían inventado palabras para decir lo que sientes por mí y hoy te puedo decir que siguen sin inventarse. Y hoy, cerrando este capítulo de mi vida, solo le pido a mis sueños que sigas siendo mi principio pero sobre todo seas mi final, te quiero Alfonso.

RESUMEN Y SUMMARY

RESUMEN

El gen *SHOX* codifica un factor de transcripción implicado en el desarrollo esquelético. Alteraciones en *SHOX* o en sus elementos reguladores están asociadas con dos displasias esqueléticas: la discondrosteosis de Léri-Weill (DLW) y la displasia mesomélica de Langer (DML), a sí mismo, se ha identificado una pequeña proporción de pacientes con talla baja idiopática (TBI). Nosotros estudiamos las características clínicas y moleculares de 12 familias españolas con múltiples miembros afectados con DLW ó DML que presentan la mutación (c.508>GC) p.A170P en heterocigosis ó en homocigosis respectivamente. En todas las familias estudiadas, la mutación p.A170P cosegrega con un fenotipo altamente penetrante que cursa con un acortamiento mesomélico de las extremidades y la deformidad de Madelung. La presencia de un haplotipo común alrededor de *SHOX* confirma la existencia de un ancestro común, probablemente de etnia gitana, puesto que 11 de las familias estudiadas pertenecen a este grupo etnico. Por primera vez, hemos observado la expression de *SHOX* en la placa de crecimiento humana de un feto de 22 semanas de gestación que presentaba DML, homocigoto para la mutación p.A170P. A pesar de que la proteína mutante está expresada en todas las regiones de la placa de crecimiento, se observa cierta desorganización en las columnas de condrocitos de la zona proliferativa. En conclusion, hemos identificado la mutación p.A170P como la primera mutación frecuente del gen *SHOX* en individuos con DLW y DML de etnia gitana.

SHOX2 es el parólogo de *SHOX* en humanos, presenta un 83% de homología a nivel de proteína y un idéntico homeodominio. Debido a esta similitud, nos planteamos la posibilidad de que *SHOX2* podría interaccionar con las mismas proteínas que interacciona *SHOX*. Demostramos que *SHOX2* interacciona con *SOX5*, *SOX6* y *MAGED1* mediante el doble híbrido de levaduras y coimmunoprecipitación en células humanas HEK293. En consecuencia, caracterizamos el dominio que está implicado en cada interacción. Para determinar la importancia fisiológica de estas interacciones, estudiamos la función que ejerce *SHOX2* en dos de las dianas transcripcionales de *SHOX*, *ACAN* y *NPPB*, importantes en el desarrollo esquelético. Nuestros resultados demuestran que *SHOX2* puede actuar como cofactor y activar la expresión de *ACAN* a través de su interacción con el trío *SOX*, mientras que *SHOX2* es capaz de activar directamente al promotor de *NPPB*. El estudio realizado con mutaciones puntuales confirma nuestros resultados. Finalmente, observamos el patrón de expresion de *SHOX2*, *SHOX*, *SOX5*, *SOX6*, *SOX9* y *MAGED1* en la placa de crecimiento humana en diferentes etapas de gestación.

SUMMARY

SHOX encodes a transcription factor involved in skeletal development. Alterations of *SHOX* and its regulatory elements have been reported in two skeletal dysplasias: Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and Langer mesomelic dysplasia (LMD) as well as in a proportion of individuals with idiopathic short stature (ISS). We studied the clinical and molecular characteristics of 12 Spanish families with multiple members affected with LWD or LMD, who present the *SHOX* mutation p.A170P (c.508>GC) in heterozygosity or homozygosity, respectively. In all studied families, the p.A170P mutation co-segregated with the fully penetrant phenotype of mesomelic limb shortening and Madelung deformity. A shared haplotype around *SHOX* was observed, confirming the presence of a common ancestor, probably of Gypsy origin, as 11 of the families were of this ethnic group. For the first time, we have shown *SHOX* expression in the human growth plate of a 22-week LMD fetus, homozygous for the p.A170P mutation. Although the mutant *SHOX* protein was expressed in all zones of the growth plate, the chondrocyte columns in the proliferative zone were disorganized with the chondrocytes occurring in smaller columnal clusters. In conclusion, we have identified p.A170P as the first frequent *SHOX* mutation in Gypsy LWD and LMD individuals.

SHOX2 is the human paralog of *SHOX*, presenting with a global homology of 83% and an identical homeodomain. Due to this similarity we set out to investigate if *SHOX2* could also interact with *SHOX* interacting proteins. Using yeast two-hybrid assays and coimmunoprecipitation in human HEK293 cells, we demonstrated that *SHOX2* interacts with *SOX5*, *SOX6* and *MAGED1* were identified. Subsequently we characterized the domains that participate in these interactions. The physiological importance of these interactions was investigated by studying the effect of *SHOX2* on two *SHOX* transcriptional targets, *ACAN* and *NPPB*, important in skeletal growth. Our results show that *SHOX2* can act as a cofactor and activate *ACAN* expression through its interaction with trio *SOX*, whilst *SHOX2* was able to activate directly the *NPPB* promoter. *SHOX2* mutations were shown to reduce the activation of these genes. Finally, we observed the expression patterns of *SHOX2*, *SHOX*, *SOX5*, *SOX6*, *SOX9* and *MAGED1* in the human growth plate, in different gestational stages.

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| Aa | Aminoácidos |
| AD | Dominio de transactivación (en inglés <i>Activation domain</i>) |
| ADN | Ácido desorirribonucleico |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| ACAN | Gen codificante de la proteína Agrecano |
| ACH | Acondroplasia |
| Ampr | Gen de resistencia a la ampicilina |
| Ala | Alanina |
| ALS | Subunidad ácido lábil, (en inglés <i>Acid-Labil Subunit</i>) |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| BLAST | Basic Local alignment Search Tool |
| BD:ADN | Dominio de unión al ADN (en inglés <i>binding domain-DNA</i>) |
| BMP | Proteína morfogénica ósea (en inglés <i>Bone morphogenetic protein</i>) |
| BMP2 | Proteína morfogénica ósea 2 (en inglés <i>Bone morphogenetic proteína 2</i>) |
| BMP4 | Proteína morfogénica ósea 4 (en inglés <i>Bone morphogenetic proteína 4</i>) |
| β-ME | β-mercaptoetanol |
| BNP | Péptido natriurético de cerebro (en inglés <i>Brain Natriuretic Peptide</i>) |
| BSA | Albúmina de suero bovino (en inglés <i>Bovine serum albumin</i>) |
| CC | Dominio <i>Coiled-Coil</i> |
| CS | Estadio Carnegie (en inglés <i>Carnegie State</i>) |
| Cent | Centromero |
| ChMM | Cultivo de micromasa en pollo |
| CNE | Secuencias conservadas no codificantes (en inglés <i>Conserved noncoding elements</i>) |
| COL2A1 | Gen codificante del la cadena pro-alfa(I) del colágeno tipo II (en inglés <i>collagen 2 type 1</i>) |
| COMP | Gen codificante del la proteína oligomérica de cartílago (en inglés <i>Cartilage oligomeric matrix gen</i>) |
| COMP | Proteína oligomérica de cartílago (en inglés <i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>) |
| CRPG | Rojo clorofenol beta-D-galactopiranosido (en inglés <i>Chlorophenol redbeta- D-galactopyranoside</i>) |
| Ct | Extremo carboxi terminal |
| DAB | Diamino-bencidina |
| DAPI | 4'-6'-diamina-2-fenilindola, (en inglés <i>4'-6'-Diamidino-2-phenylindole</i>) |

| | |
|-------------------------------|---|
| DE | Desviación estándar |
| dHPLC | Cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante (en inglés <i>Denaturing high performance liquid chromatography</i>) |
| Dlxin-1 | Proteína <i>Dlx interaction 1</i> |
| DLX5 | Proteína Distal Less Homeobox 5 |
| DLX6 | Proteína Distal Less Homeobox 6 |
| DLW | Discondrosteosis de Léri-Weill |
| DMEM | Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbeco (en inglés <i>Dulbeco's Modified Eagle's Medium</i>) |
| DML | Displasía mesomélica de Langer |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| dNTPs | Desoxirribonucleótidos trifosfato |
| DO | Densidad óptica |
| DsRED | Proteína roja fluorescente de <i>Discosoma sp</i> (en inglés <i>Discosoma sp. red fluorescent protein</i>) |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EMSA | Ensayo de retardo en la movilidad electroforética (en inglés <i>Electrophoretic mobility shift assay</i>) |
| ER | Receptor de estrógenos |
| ER-α | Receptor de estrógenos- α |
| ER-β | Receptor de estrógenos- β |
| EXO-SAP-IT | Exonucleasa I y Fosfatasa alcalina |
| FBS | Suero fetal bovino (en inglés <i>Fetal bovine serum</i>) |
| FGF | Factor de crecimiento fibroblástico (en inglés <i>Fibroblast growth factor</i>) |
| Fgf10 | Factor de crecimiento fibroblástico 10 (en inglés <i>Fibroblast growth factor 10</i>) |
| FGFR | Receptor de FGF |
| FGFR3 | Receptor del factor de crecimiento fibroblástico 3 (en inglés <i>Fibroblast growth factor receptor 3</i>) |
| FLAG | Péptido utilizado como epítipo |
| GAL4 | Factor de transcripción GAL4 |
| GFP | Proteína verde fluorescente de <i>Aequorea victoria</i> (en inglés <i>Aequorea victoria green fluorescent protein</i>) |
| GH | Hormona de crecimiento (en inglés <i>Growth Hormone</i>) |
| GHRH | Hormona liberadora de GH (en inglés <i>Growth Hormone Releasing Hormone</i>) |

| | |
|----------------------|--|
| HA | Péptido de la proteína hemaglutinina |
| HD | Homeodominio |
| HEK293 | Células de riñón de embrión humano (en inglés <i>Human embryonic kidney</i>) |
| HELA | Células derivadas del cáncer cervical de Henrietta Lacks |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid |
| HIPK-1 | Proteína quinasa que interacciona con proteínas homeodominio 1 (en inglés <i>Homeodomain interacting protein kinase 1</i>) |
| HMG | Dominio <i>High mobility group</i> |
| HOX9 | Homeobox 9 |
| Hoxa11/Hoxd11 | Homeobox a11 y d11 |
| HRM | Análisis de fusión de alta resolución (en inglés <i>High resolution meeting</i>) |
| IAP | Inhibidor de apoptosis |
| IGFBP3 | Proteína 3 de unión al factor de crecimiento semejante a la insulina (en inglés <i>Insuline-like growth factor-binding protein 3</i>) |
| IGF-I | Factor de crecimiento semejante a la insulina I (en inglés <i>Insulin like Growth Factor I</i>) |
| IGF-1 | Gen que codifica el factor de crecimiento semejante a la insulina I |
| IGFI-R | Receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina I (en inglés <i>Insulin like Growth Factor I receptor</i>) |
| IGFII | Factor de crecimiento semejante a la insulina II (en inglés <i>Insulin like Growth Factor II</i>) |
| IHH | Proteína homóloga de Indian Hedgehog (en inglés <i>Indian Hedgehog Homolog</i>) |
| IP | Inmunoprecipitado |
| IRD | Dominio de repeticiones entremezcladas (en inglés <i>Interspersed repeat domain</i>) |
| Kanr | Gen de resistencia a la kanamicina |
| Kb | Kilobase |
| LacZ | Gen que codifica la enzima β -galactosidasa |
| LB | Medio de crecimiento rico de <i>E.coli</i> (en inglés <i>Lysogeny broth</i>) |
| Leu | Leucina |
| LEU2 | Gen que codifica una enzima implicada en la biosíntesis de la leucina |
| MAGED1 | Antígeno de melanoma D1 (en inglés <i>Melanoma antigen D1</i>) |
| Mb | Megabase |
| MHD2 | Segundo dominio de homología MAGE (en inglés <i>Melanoma antigen</i>) |

| | |
|---------------|--|
| | <i>homology domain 2)</i> |
| MLPA | Amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación (en inglés <i>Multiplex ligation dependent probe amplification</i>) |
| Msx1 | Proteína Msh homeobox 1 (en inglés <i>Muscle segment homeobox 1</i>) |
| Msx2 | Proteína Msh homeobox 2 (en inglés <i>Muscle segment homeobox 2</i>) |
| MTN1 | Gen que codifica a la matrilinea-1 |
| NCBI | Centro nacional para la información biotecnológica (en inglés <i>National Center for Biotechnology Information</i>) |
| NHD | Dominio de homología con Necdin (en inglés <i>Necdin homology domain</i>) |
| NKX1.2 | Proteína <i>NK1 homeobox 2</i> |
| NKX2.5 | Proteína <i>NK2 homeobox 5</i> |
| NKX3.2 | Proteína <i>NK3 homeobox 2</i> |
| NPPB | Gen que codifica el precursor del péptido natriurético B (en inglés <i>Natriuretic Peptide Precursor B</i>) |
| NRAGE | Proteína homóloga de MAGED1 en rata (en inglés <i>Neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog</i>) |
| Nt | Extremo amino terminal |
| OAR | Dominio <i>Otp, Aristaless, Rax</i> |
| OMIM | Línea de herencia mendeliana en hombre (en inglés <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>) |
| PAR1 | Región pseudoautosómica 1 (en inglés <i>Pseudoautosomical Region 1</i>) |
| Pb | Pares de bases |
| PBS | Tampón fosfato salino (en inglés <i>Phosphate buffered saline</i>) |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa (en inglés <i>Polymerase chain reaction</i>) |
| PEG | Polietilenglicol |
| PL | Tampón de lisis pasiva (en inglés <i>passive lysis buffer</i>) |
| PKM2 | Péptido seleccionado de la región C-terminal de la proteína humana PKM2 (en inglés <i>Piruvate kinasa isozyme M2</i>) |
| PTH | Hormona paratifoidea (en inglés <i>Parathyroid hormone</i>) |
| PTHrP | Proteína relacionada con la hormona paratiroidea (en inglés <i>Parathyroid hormone-related protein</i>) |
| p75NTR | Receptor de neurotrofina p75 (en inglés <i>p75 neurotrophin receptor</i>) |
| RUNX2 | Factor de transcripción relacionado con Runt 2 (en inglés <i>Runt-related transcription factor 2</i>) |

| | |
|----------------------------|--|
| RUNX3 | Factor de transcripción relacionado con Runt 3 (en inglés <i>Runt-related transcription factor 3</i>) |
| <i>S.cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SAN | Nodo sino-atrial |
| SD | Medio de crecimiento selectivo de levaduras (en inglés <i>Synthetic defined</i>) |
| SDS | Sulfato de dodecilo sódico |
| Ser | Serina |
| Shh | <i>Sonic hedgehog</i> |
| SHOX | Gen <i>SHOX</i> (en inglés <i>Short stature HOmeoboX-containing gene</i>) |
| SHOX2 | Gen <i>SHOX2</i> (en inglés <i>Short stature HOmeoboX-containing gene 2</i>) |
| SLN | Señal de localización nuclear |
| SOX5 | Proteína <i>Sry box 5</i> |
| SOX6 | Proteína <i>Sry box 6</i> |
| SOX9 | <i>Proteína Sry box 9</i> |
| SS | Somatostatina |
| SSTRs | Receptor del inhibidor de la somatostatina |
| ssDNA | Sal sódica de ácido desoxirribonucleico (en inglés <i>Sodium salt deoxyribonucleic acid</i>) |
| STQ | Dominio Serina-Treonina-Quinasa |
| TBI | Talla baja idiopática |
| 1-TBP18 | Proteína TBP de humano, rata y ratón (en inglés <i>TATA-binding proteína 1</i>) |
| TE | Tampón Tris-EDTA |
| Tel | Telómero |
| TGF-β | Factor de crecimiento transformante beta (en inglés <i>Transforming Growth Factor Beta</i>) |
| Tm | Temperatura de fusión (en inglés <i>melting temperature</i>) |
| Trp | Triptófano |
| TRP1 | Gen que codifica una enzima implicada en la biosíntesis del triptófano |
| T3 | Triyodotironina |
| T4 | Tetrayodotironina o tiroxina |
| UTR | Secuencia no traducida (en inglés <i>UnTranslated Region</i>) |
| U2OS | Células de osteosarcoma humano |
| WB | Western-blot |
| YPDA | Medio de crecimiento rico para levaduras (en inglés <i>Yeast peptone dextrose adenine</i>) |

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN | 31 |
| 1. CRECIMIENTO | 33 |
| 2. CRECIMIENTO ÓSEO | 33 |
| 2.1. Estructura del hueso | 33 |
| 2.2. Composición celular del hueso | 33 |
| 2.3. Tipos de osificación | 34 |
| 2.3.1. Osificación intramembranosa: | 34 |
| 2.3.2. Osificación endocondral: | 34 |
| 2.4. Proteínas de la matriz extracelular | 36 |
| 3. PLACA DE CRECIMIENTO | 37 |
| 3.1. Morfología de la placa de crecimiento | 37 |
| 3.2. Regulación de la placa de crecimiento | 38 |
| 3.2.1. Regulación hormonal de la placa de crecimiento | 38 |
| 3.2.1.1. Sistema GH-IGF-I | 38 |
| 3.2.1.2. Hormonas tiroideas | 39 |
| 3.2.1.3. Hormonas sexuales | 39 |
| 3.2.2. Factores intrínsecos o regulación local | 40 |
| 3.2.3. Regulación transcripcional | 40 |
| 4. SHOX | 44 |
| 4.1. Gen | 44 |
| 4.2. Proteína SHOX | 44 |
| 4.3. Regulación de SHOX | 45 |
| 4.4. Regulación de SHOX mediante HOX9 | 46 |
| 4.5. Cofactores de SHOX | 47 |
| 4.5.1. SOX5 y SOX6 | 47 |
| 4.5.2. SOX9 y el trío de Sox | 48 |
| 4.5.3. MAGED1 (Melanoma antigen D1) | 49 |
| 4.6. Dianas transcripcionales de <i>SHOX</i> | 50 |
| 4.7. Expresión de SHOX | 51 |
| 5. PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL GEN <i>SHOX</i> | 52 |
| 5.1. Discondrosteosis de Léri-Weill | 52 |
| 5.2. Displasia mesomélica de Langer | 53 |
| 5.3. Talla baja idiopática | 53 |
| 6. SHOX2 | 54 |
| 6.1. Gen y proteína | 54 |
| 6.2. Expresión | 55 |
| 6.2.1. Expresión de SHOX2 en hueso | 55 |
| 6.2.2. Expresión de SHOX2 en corazón | 56 |
| 6.2.3. Expresión de SHOX2 en paladar | 56 |
| 6.3. Función | 56 |
| 6.3.1. Función de SHOX2 en el desarrollo del esqueleto | 56 |
| 6.3.2. Función de SHOX2 en el desarrollo del corazón | 57 |
| 6.3.3. Función de SHOX2 en el desarrollo del paladar | 57 |
| 6.4. Patologías asociadas a alteraciones en el gen <i>SHOX2</i> | 58 |
| HIPÓTESIS | 59 |
| Hipótesis | 61 |
| OBJETIVOS | 63 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 1 | 65 |
| CAPÍTULO 2 | 65 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 67 |
| 1. CONSTRUCCIONES | 69 |
| 1.1. ADNc | 69 |
| 1.2. Vectores de expresión..... | 69 |
| 1.3. Clonación | 69 |
| 1.4. Mutagénesis dirigida | 71 |
| 2. ANTICUERPOS | 72 |
| 3. INMUNOHISTOQUÍMICA | 72 |
| 4. DOBLE HÍBRIDO DE LEVADURAS | 73 |
| 4.1. Ensayo del doble híbrido de levaduras..... | 73 |
| 4.2. Transformación de levaduras | 74 |
| 4.3. Ensayo líquido de Beta-galactosidasa..... | 75 |
| 5. ESTUDIOS CELULARES | 76 |
| 5.1. Líneas celulares y medio de crecimiento..... | 76 |
| 5.2. Transfección..... | 76 |
| 5.3. Lisis celular | 76 |
| 6. INMUNOPRECIPITACIÓN..... | 77 |
| 7. INMUNOCITOQUÍMICA..... | 78 |
| 8. ENSAYO DE LUCIFERASA | 78 |
| 9. ESTUDIOS GENÉTICOS | 79 |
| 10. ANÁLISIS MUTACIONAL | 79 |
| 11. ANÁLISIS DEL HAPLOTIPO | 80 |
| 12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 80 |
| 13. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO | 81 |
| RESULTADOS | 83 |
| CAPITULO 1. IDENTIFICACIÓN DE LAS DIANAS TRANSCRIPCIONALES Y CARACTERIZACIÓN DE LAS INTERACCIONES PROTEICAS DE SHOX2..... | 85 |
| 1. DIMERIZACIÓN DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE SHOX2 | 85 |
| 1.1. Localización del dominio de SHOX2 implicado en la dimerización | 86 |
| 1.2. Localización del dominio de SHOX2 implicado en la interacción con SHOX2 mediante la capacidad de dimerización de los mutantes de SHOX2 con la proteína SHOX2..... | 87 |
| 2. INTERACCIÓN DE SHOX2-SHOX | 88 |
| 2.1. Localización del dominio de SHOX2 implicado en la interacción con SHOX | 88 |
| 2.2. Confirmación de la interacción de SHOX2 con SHOX mediante inmunoprecipitación en células humanas | 89 |

| | |
|--|-----|
| 3. IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON SHOX2 | 90 |
| 3.1. Confirmación de la interacción de SHOX2 con las proteínas, SOX5, SOX6 y MAGED1 mediante inmunoprecipitación en células humanas | 91 |
| 4. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE SHOX2 CON SOX6 | 93 |
| 4.1. Localización del dominio de SHOX2 implicado en la interacción con SOX6 | 93 |
| 4.2. Identificación del dominio de SOX6 implicado en la interacción con SHOX2 | 95 |
| 5. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE SHOX2 CON MAGED1 | 96 |
| 5.1. Identificación del dominio de interacción de SHOX2 con MAGED1 | 96 |
| 5.2. Identificación del dominio de MAGED1 implicado en la interacción con SHOX2 | 99 |
| 6. COEXPRESIÓN DE SHOX, SOX5, SOX6, SOX9 y MAGED1 CON SHOX2 EN LA PLACA DE CRECIMIENTO HUMANA | 100 |
| 7. ANÁLISIS MUTACIONAL | 103 |
| 7.1. Análisis mutacional de SOX5 y SOX6 | 103 |
| 8. IDENTIFICACIÓN DE LAS POSIBLES DIANAS TRANSCRIPCIONALES DE SHOX2 | 104 |
| 8.1. Investigación de <i>NPPB</i> como posible diana transcripcional de SHOX2 | 104 |
| 8.1.1. SHOX2 activa directamente al promotor de <i>NPPB</i> en células de osteosarcoma humano | 104 |
| 8.1.2. Función de SHOX2 y del trío SOX en la activación del promotor de <i>NPPB</i> | 105 |
| 8.2. Identificación de <i>ACAN</i> como diana transcripcional de SHOX2 | 106 |
| 8.2.1. SHOX2 coopera con el trío SOX en la activación del <i>enhancer</i> de <i>ACAN</i> | 106 |
| 8.3. Determinación de <i>Col2a1</i> como posible diana transcripcional de SHOX2 | 108 |
| 8.3.1. Función de SHOX2 y del SOX trío en la activación de <i>Col2a1</i> | 108 |
| CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DOS MUTACIONES DEL GEN SHOX | 110 |
| 1. DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES p.A170P y p.A170D | 110 |
| 2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTACIONES p.A170P y p.A170D | 110 |
| 2.1. Caracterización clínica de los individuos que presenta la mutación p.A170P | 110 |
| 2.2. Caracterización clínica de los individuos que presentan la mutación p.A170D | 116 |
| 2.3. Análisis del haplotipo de las doce familias estudiadas con la mutación p.A170P | 116 |
| 2.4. Análisis del haplotipo de las familias estudiadas para la mutación p.A170D | 119 |
| 3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS MUTANTES DE SHOX, p.A170P Y p.A170D | 120 |
| 4. INMUNOHISTOQUÍMICA | 122 |
| DISCUSIÓN | 123 |
| CAPITULO 1 | 125 |
| 1. Caracterización de las dimerizaciones entre las diferentes isoformas de SHOX2 y SHOX: importancia de la función fisiológica de las dimerizaciones | 125 |

| | |
|--|-----|
| 2. Identificación de SOX5 y SOX6, miembros junto con SOX9 del trío de SOX, como proteínas que interactúan con SHOX2..... | 126 |
| 3. Importancia funcional de la identificación de las dianas transcripcionales de SHOX2 | 127 |
| 4. Identificación y caracterización de las interacciones proteicas entre SHOX2 y MAGED1 | 130 |
| 5. Patrón de expresión de SHOX2 y SHOX y la implicación de su posible redundancia funcional durante el desarrollo embrionario humano | 131 |
| CAPÍTULO 2 | 133 |
| Caracterización de la mutación p.A170P. Teorías sobre el origen de la mutación | 133 |
| CONCLUSIONES | 137 |
| CAPÍTULO 1 | 139 |
| CAPITULO 2 | 140 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 141 |
| ANEXO I..... | 157 |
| ANEXO II..... | 163 |

INTRODUCCIÓN

1. CRECIMIENTO

Se considera crecimiento al aumento irreversible en el tamaño de un organismo como consecuencia de la proliferación celular que conduce a la formación de estructuras más especializadas hasta alcanzar la madurez morfológica y su plena capacidad funcional. El crecimiento está modulado tanto por factores intrínsecos como extrínsecos. Los factores intrínsecos pueden afectar a las células en su crecimiento, entre ellos se encuentran las hormonas y los factores genéticos. Y los factores extrínsecos que pueden ser tanto factores ambientales como la alimentación.

2. CRECIMIENTO ÓSEO

2.1. Estructura del hueso

El esqueleto está constituido por los huesos, que forman el tejido óseo, la médula ósea y el periostio. El aspecto macroscópico del hueso se puede observar con mayor claridad en los huesos largos (Fig.1).

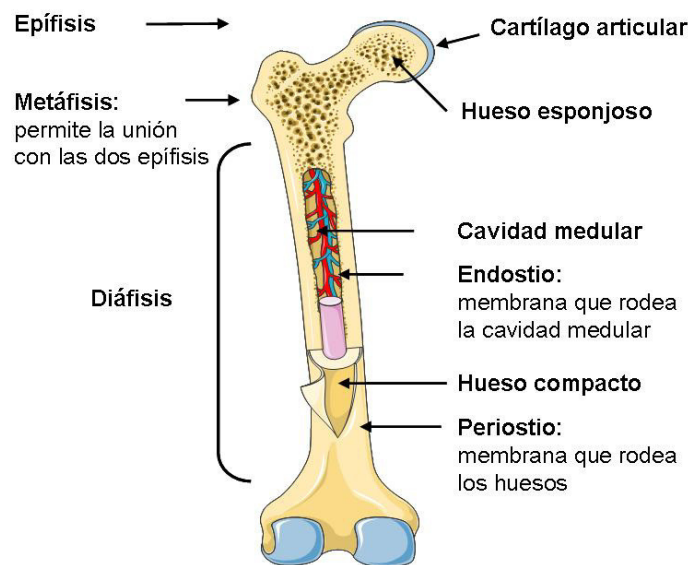


Figura 1. Aspecto macroscópico del hueso. Los huesos largos del esqueleto se dividen en tres partes: la diáfisis, situada en el centro del hueso; la epífisis, situada en los dos extremos; y la metáfisis, situada entre la diáfisis y las dos epífisis. Están rodeados de dos membranas, el endostio y el periostio.

2.2. Composición celular del hueso

El hueso está compuesto por diferentes tipos de células. Entre ellas destacan:

Células osteoprogenitoras u osteógenas, son células de origen mesenquimal, se localizan en la superficie externa e interna del hueso y durante su proceso de formación se dividen y se diferencian a osteoblastos. Son capaces de dividirse y proliferar y poseen

capacidad de diferenciarse, además de a osteoblastos, a otros tres tipos celulares: adipocitos, condroblastos y fibroblastos.

Osteoblastos, son las células responsables de la formación y organización de la matriz extracelular del hueso y de su posterior mineralización. Surgen como diferenciación de las células osteoprogenitoras, bajo la influencia de la familia de la proteína morfogénica ósea (BMP; *Bone morphogenetic protein*) y del factor beta transformador de crecimiento (TGF- β , *Transforming growth factor- β*) (Massagué et al., 1998).

El principal producto de los osteoblastos maduros es el colágeno de tipo I que constituye el 90% de las proteínas del hueso. Además, producen otras proteínas como la osteocalcina y las proteínas Gli matriciales, y glicoproteínas fosforiladas incluyendo las sialoproteínas I y II, la osteopontina y la osteonectina. Las principales proteínas con actividad enzimática producidas por los osteoblastos son la fosfatasa alcalina y la collagenasa.

Osteocitos: células formadas a partir de la diferenciación de los osteoblastos, se encuentran en el hueso completamente formado, por lo que han perdido su capacidad de dividirse. En cuanto a su forma, son similares a los osteoblastos.

Osteoclastos: células multinucleadas, de gran tamaño, que degradan y reabsorben la matriz ósea. Se originan por fusión de monocitos que han abandonado la sangre circulante, contienen numerosos lisosomas y su superficie está en contacto con la matriz a reabsorber.

2.3. Tipos de osificación

La osificación es el conjunto de mecanismos por medio de los cuales se forma el tejido óseo. Existen dos tipos de osificación:

2.3.1. Osificación intramembranosa:

Es el proceso mediante el cual se forman los huesos planos. Las células mesenquimales que forman las membranas de tejido conjuntivo son transformadas en osteoblastos constituyendo un centro de osificación alrededor del cual se va formando el hueso. Los osteoblastos producen la matriz ósea y las fibras de colágeno que la rodean se convierten en osteocitos dando lugar a las trabéculas. Estas trabéculas se unen para producir células esponjosas que son las responsables de generar médula ósea roja. Finalmente, las células que rodean los huesos en desarrollo producen el periostio y a partir de éste, los osteoblastos en la matriz ósea, producen el hueso compacto.

2.3.2. Osificación endocondral:

La osificación endocondral tiene como fin la producción de tejido óseo a partir de tejido cartilaginoso. Mediante este proceso se forman el resto de los huesos del cuerpo.

Comienza con la condensación de las células mesénquimales y su posterior diferenciación a condrocitos (Fig.2). Tras la diferenciación, los condrocitos comienzan a proliferar y a secretar diferentes componentes de la matriz extracelular, como son el colágeno de tipo II y el agregano. Durante la elongación de los elementos esqueléticos, los condrocitos proliferan a dos subpoblaciones celulares bien diferenciadas bioquímica y morfológicamente, por una parte los condrocitos distales, con una baja capacidad de proliferación, y por otra parte, los condrocitos de alta capacidad de proliferación, que se organizan en columnas hacia la zona central del molde del cartílago donde se forma el centro de osificación primario. En este momento, cesa la proliferación de los condrocitos, los cuales empiezan a hipertrofiarse, aumentan de tamaño y expresan predominantemente, colágeno de tipo X. El incremento de volumen de las células hipertróficas, contribuye significativamente a la elongación de los elementos esqueléticos y dirige la mineralización de la matriz que les rodea. Los elementos del cartílago se rodean de una capa de células similares a fibroblastos, llamada pericondrio. Adyacente a las células de la zona hipertrófica, las células del pericondrio, dirigidas por los condrocitos hipertróficos, se diferencian a osteoblastos, formando el periostio o collar óseo (capa de células que rodea al hueso).

Posteriormente, se digiere la antigua matriz extracelular y los osteoblastos secretan matriz ósea. Cuando los condrocitos hipertróficos entran en apoptosis, desde el periostio, los vasos sanguíneos invaden la matriz calcificada y finalmente, la matriz cartilaginosa es reemplazada por hueso trabecular formando la llamada espongia primaria.

Mientras que los condrocitos hipertróficos realizan estas actividades en el centro del cartílago, el resto de condrocitos continúan proliferando y alargando el cartílago. Una porción de estos condrocitos proliferativos se aplanan en forma de disco y forman columnas que dirigen el alargamiento del hueso hacia una dirección determinada. El alargamiento del hueso depende del ratio de producción de condrocitos hipertróficos a partir de estos condrocitos proliferativos. A medida que el hueso se alarga, se forman los centros de osificación secundarios al final de los huesos largos, donde los condrocitos proliferativos detienen su proliferación, entran en apoptosis y el cartílago es invadido por vasos sanguíneos y células osteogénicas.

En los huesos largos de las extremidades, los condrocitos continúan proliferando entre los centros de osificación primario y secundario. El cartílago que forma estos condrocitos se conoce como placa de crecimiento, y desaparece tras una etapa de crecimiento y posterior osificación de la misma.

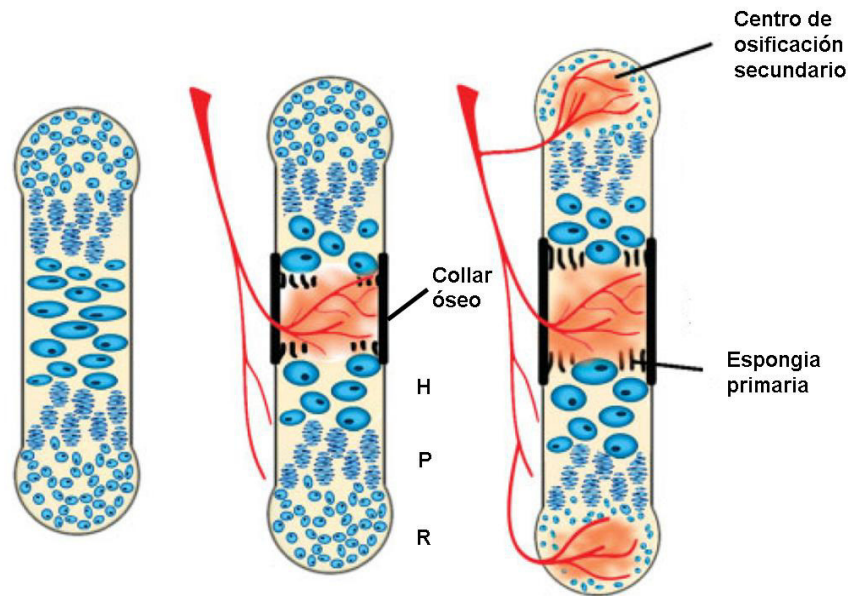


Figura 2. Osificación endocondral. Durante la osificación endocondral, los condrocitos se organizan en las diferentes regiones de la placa de crecimiento: la zona de reserva (R), proliferativa (P) e hipertrófica (H). Las células del pericondrio adyacentes a los condrocitos hipertróficos se convierten en osteoblastos formando el collar óseo, que forman la espongia primaria. Cuando los condrocitos se hipertrofian, esta zona es invadida por vasos sanguíneos y reemplazada por tejido óseo y médula ósea en el llamado centro de osificación primario. Después del nacimiento, y mediante un proceso similar, se originan los centros de osificación secundarios, y la placa de crecimiento se encuentra ubicada entre estos dos centros (Solomon et al., 2008).

2.4. Proteínas de la matriz extracelular

La matriz extracelular proporciona un medio para las células. Está producida y modificada por las propias células que la constituyen, es decir, los condrocitos, que sintetizan y secretan diferentes proteínas específicas de la matriz extracelular.

El primer grupo de moléculas que constituyen la matriz extracelular son los diferentes tipos de colágenos, destacando entre ellos, el colágeno de tipo II, IX y X. Su expresión en la placa de crecimiento está localizada, mayoritariamente, en la zona proliferativa, prehipertrófica e hipertrófica, respectivamente (Horton et al., 1993). Mutaciones en los genes codificantes de los mismos están asociadas con alteraciones de la matriz extracelular, causando diferentes displasias asociadas con la talla baja (Horton et al., 1992; Spranger et al., 1994; Muragaki et al., 1996; Wallis et al., 1996).

El otro grupo de moléculas implicadas en la matriz extracelular, son los proteoglicanos, entre ellos el agregano (Baldwin et al., 1989), que posee unas propiedades osmóticas necesarias para resistir las cargas de compresión a las que está sometido el cartilago y las glicoproteínas, como COMP (*Cartilage oligomeric protein*). Mutaciones en COMP están asociadas a pseudocondrodisplasia (MIM 177170, Maroteaux & Lamy, 1959) y a displasia epifisaria múltiple (MIM 132400, Briggs et al., 1995) (Deere et al., 1999; Maddox et al., 2000).

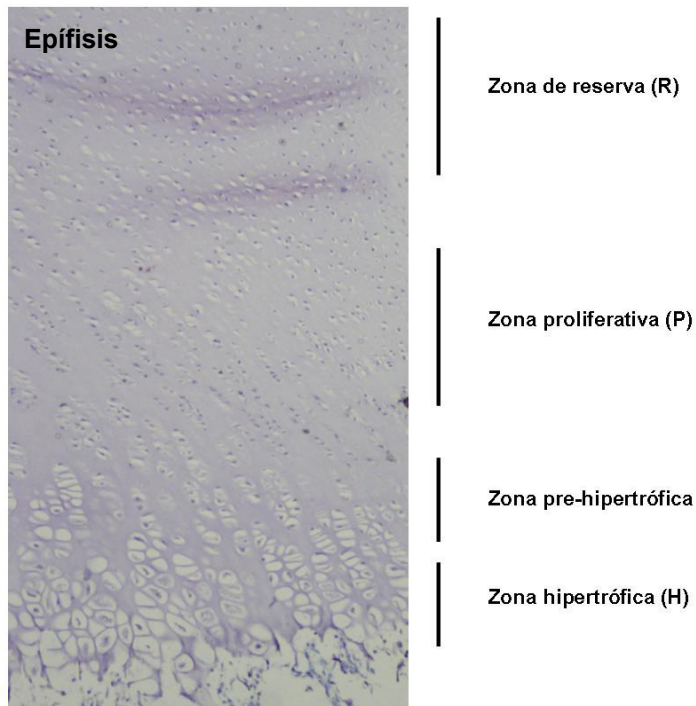


Figura 3. Histología de la placa de crecimiento. En la figura se indican las diferentes zonas que forman la placa de crecimiento. Cerca de la epífisis, los condrocitos empiezan a distribuirse en la zona de reserva (R), se van agrupando en columnas constituyendo la zona proliferativa (P) y finalmente aumentan de tamaño, dejan de dividirse y se diferencian a condrocitos hipertróficos en las zonas pre-hipertrófica e hipertrófica (H), donde finalmente mueren por apoptosis.

3. PLACA DE CRECIMIENTO

3.1. Morfología de la placa de crecimiento

La placa de crecimiento se encuentra localizada entre los centros de osificación primario y secundario. En ella se pueden apreciar cuatro zonas diferentes: zona de reserva, proliferativa, pre-hipertrófica e hipertrófica (Fig.3). **La zona de reserva**, está situada al final de la epífisis. En esta región, el ratio de volumen celular y de matriz extracelular es alto y las células están relativamente en estado quiescente (Ballock et al., 2003). En la **zona proliferativa**, los condrocitos presentan una morfología más aplanada, empiezan a dividirse, sintetizan grandes cantidades de matriz extracelular y se disponen en columnas paralelas al eje longitudinal del hueso. En la **zona pre-hipertrófica**, los condrocitos aumentan de tamaño, cesan su proliferación y empiezan a expresar proteínas características de la **zona hipertrófica**. Estos condrocitos continúan diferenciándose hasta convertirse en hipertróficos, caracterizados por su forma redondeada y su gran tamaño. Las células de esta región cesan su división celular y empiezan a diferenciarse, esto conlleva un aumento en el volumen celular, un incremento considerable de la fosfatasa alcalina y una síntesis y secreción de colágeno de tipo X, un tipo de colágeno que solo se sintetiza en ésta región de la placa de crecimiento (Ballock et al., 2003). Estos condrocitos sufren un proceso de mineralización, y finalmente, mueren por apoptosis.

3.2. Regulación de la placa de crecimiento

3.2.1. Regulación hormonal de la placa de crecimiento

3.2.1.1. Sistema GH-IGF-I

El sistema GH-IGF-I regula el crecimiento longitudinal del hueso, especialmente en la placa de crecimiento (Lupu et al., 2001). La hormona de crecimiento (*Growth Hormone*, GH) y el factor IGF-I (*Insulin-like Growth Factor I*) actúan principalmente controlando el balance entre la proliferación y la diferenciación de los condrocitos de la placa de crecimiento y en todas las células óseas (Bex et al., 2003).

La regulación fisiológica de la secreción de GH está determinada al nivel hipofisario por las acciones contrapuestas de dos neuropéptidos de origen hipotalámico, el factor liberador de GH o GHRH (*GH releasing hormone*) y el inhibidor de la secreción de GH, la somatostatina (SS). La acción reguladora de ambos neuropéptidos sobre la secreción de GH está mediada por receptores específicos localizados en la adenohipófisis: GHRHR y SSTRs.

La GH desempeña una regulación dual sobre la placa de crecimiento (Ohlsson et al., 1992). Por una parte, actúa directamente sobre la placa de crecimiento estimulando la proliferación de los condrocitos de la zona de reserva de modo independiente a la IGF-I (Ohlsson et al., 1992). Y por otra, presenta durante el crecimiento postnatal un efecto indirecto, puesto que la GH secretada por la glándula pituitaria, actúa en el hígado a través de su receptor GHR (*Growth Hormone Receptor*), estimulando la síntesis de IGF-I y de sus proteínas de transporte, ALS (*Acid-Labile Subunit*) e IGFBP3 (*Insulin-like growth factor-binding protein 3*). La fracción mayoritaria de IGF-I circula en el torrente sanguíneo formando un complejo ternario con IGFBP3 y ALS. La acción de proteasas específicas libera la IGF-I del complejo ternario permitiendo su interacción con su receptor de membrana en los órganos diana, IGFIR, (*Insulin like Growth Factor I receptor*) donde IGF-I actúa como un factor endocrino, estimulando el crecimiento longitudinal del hueso (Daughaday et al., 2000; Yakar et al., 2002) (Fig 4).

La deficiencia de GH afecta principalmente al crecimiento postnatal debido a la dependencia de la síntesis de IGF-I de un aporte suficiente de GH. Sin embargo, durante el periodo prenatal (Rosenfeld et al., 1994; Wit et al., 1996; Kofoed et al., 2003), la velocidad de crecimiento depende exclusivamente de un aporte suficiente de IGF-I e IGF-II, no dependiente de GH durante esta fase del crecimiento (Woods et al., 1996; Abuzzahab et al., 2003).

El hecho de que los condrocitos produzcan y respondan a IGF-I (Ohlsson et al., 1998 y Reinecke et al., 2000) y que el ratio de crecimiento longitudinal sea dependiente del ratio de proliferación de los condrocitos (Sjögren et al., 2002; Yakar et al., 2002; Wang et

al., 1999), implica que la producción de IGF-I en los condrocitos juega un papel fundamental en el crecimiento longitudinal del hueso.

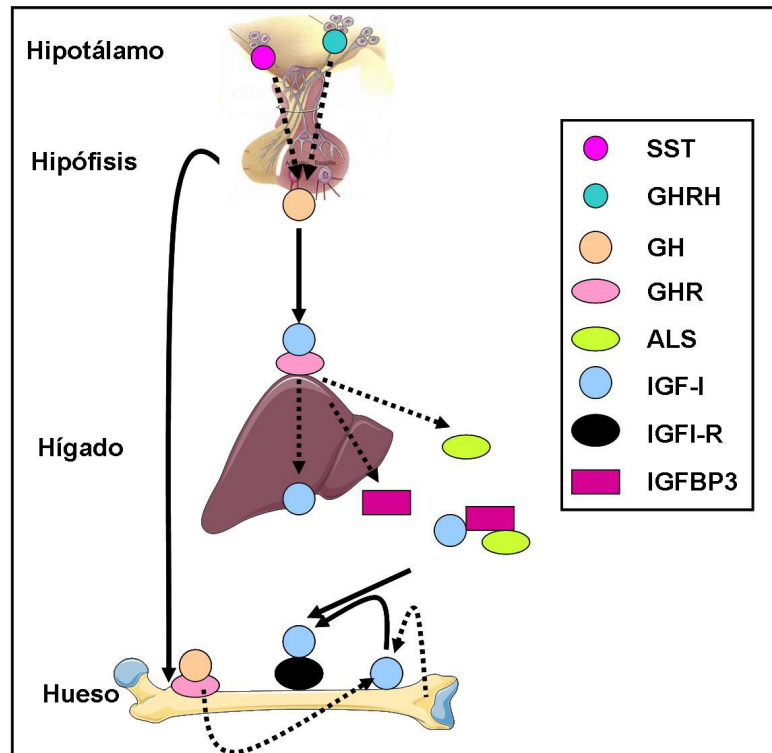


Figura 4. Regulación del eje GH/IGF-I. La hormona de crecimiento (GH) liberada en la hipófisis, actúa en el hígado a través de su receptor (GHR) y estimula la síntesis de IGF-I (Factor de crecimiento parecido a la insulina I) y de sus dos proteínas de transporte mayoritarias ALS (Subunidad ácido lábil) e IGFBP3 (Proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina). La fracción mayoritaria de IGF-I circula en el torrente sanguíneo formando un complejo ternario con IGFBP3 y ALS. La IGF-I es liberada del complejo ternario, interacciona con su receptor de membrana en los órganos diana (IGFIR), y estimula el crecimiento longitudinal del hueso. Además existe una acción directa de la GH sobre la placa de crecimiento activando la proliferación de los condrocitos.

3.2.1.2. Hormonas tiroideas

La función primaria de la glándula tiroidea es la síntesis y liberación de dos hormonas, la Triyodotironina (T3) y la Tiroxina (T4) que cumplen funciones muy importantes durante el desarrollo óseo. Estas hormonas son esenciales para la diferenciación y la organización de los condrocitos en columnas así como para la osificación endocondral (Stevens et al., 2000). Los estudios en ratas hipotiroideas, eutiroideas, tirotóxicas y ratas con deficiencia en T4 muestran una grave desorganización de los condrocitos de la placa de crecimiento mostrando la importancia de estas hormonas sobre su regulación (Stevens et al., 2000).

3.2.1.3. Hormonas sexuales

Las hormonas sexuales juegan un papel importante durante el crecimiento

longitudinal del hueso, especialmente durante la pubertad.

Los **estrógenos** son conocidos por la función que desempeñan en la maduración de la placa de crecimiento y en la fusión epifisaria. Regulan y aceleran el programa de senescencia en la placa de crecimiento mediante el aumento de la velocidad de proliferación de los condrocitos, lo que conlleva una fusión prematura de la placa de crecimiento (Weise et al., 2001; Chagin & Sävendahl, 2007). La función de los estrógenos está mediada por la acción de sus receptores (ER), ER- α y ER- β , que se expresan en la placa de crecimiento durante el desarrollo puberal (Sävendahl et al., 2005).

Los **andrógenos** también contribuyen a la regulación del crecimiento, pero en este caso, estimulan el crecimiento longitudinal del hueso (Cassorla et al., 1984; Zung et al., 1999) mediante la unión a su receptor, que está expresado en los condrocitos de la placa de crecimiento (Abu et al., 1997; Krohn et al., 2003; Nilsson et al., 2003). Esta unión estimula la proliferación y la diferenciación de los condrocitos, la producción de matriz extracelular y la expresión local de IGF-I (Maor et al., 1999; Krohn et al., 2003).

3.2.2. Factores intrínsecos o regulación local

La placa de crecimiento también está regulada por factores intrínsecos, algunos de ellos están detallados en la tabla 1.

3.2.3. Regulación transcripcional

Son muchos los factores de transcripción que ejercen su actividad en la placa de crecimiento. Cada uno de ellos desempeña una función diferente y mutaciones en los genes codificantes de los mismos, están asociados a diferentes patologías. Entre los diferentes factores conocidos implicados en la regulación del crecimiento esquelético, podemos destacar los incluidos en la tabla 2, por estar relacionados con el estudio de la presente Tesis doctoral.

Tabla 1: Factores intrínsecos que regulan la placa de crecimiento.

| FACTORES INTRÍNSECOS | EXPRESIÓN | FUNCIÓN | REFERENCIAS |
|---|--|--|--|
| Parathyroid (PTH)-related peptide | Condrocitos proliferativos y prehipertróficos. | Regulación de la homeostasis del calcio y del hueso. Mantenimiento de los condrocitos en estado proliferativo, previniendo la hipertrofia | Lee et al., 1996 Kronenberg et al., 2006 Pinheiro et al., 2012 |
| IHH <i>(Indian hedgehog)</i> | Condrocitos prehipertróficos e hipertróficos. | Desarrollo embrionario. Estimulación de la proliferación de los condrocitos. Inhibición de la diferenciación de condrocitos hipertróficos. | Kronenberg et al., 2003 Long et al., 2001 |
| BMP <i>(Bone morphogenetic protein)</i> | Expresión diferencial: <ul style="list-style-type: none"> • BMP2-7; pericondrio. • BMP6;condrocitos prehipertróficos e hipertróficos. | Regulación del crecimiento, diferenciación y morfogénesis. | Reddi et al., 2001 Rosen et al., 2002 |
| FGF <i>(Fibroblast growth factor)</i> Ó FGFR <i>(Fibroblast growth factor receptor)</i> | FGF; expresión en condrocitos proliferativos. Expresión diferencial: <ul style="list-style-type: none"> • FGFR1; condrocitos prehipertróficos e hipertróficos. • FGFR2; Células del pericondrio. • FGFR3; Condrocitos proliferativos. | Regulación de la proliferación y diferenciación de los condrocitos. Estimulación de la diferenciación de los condrocitos. FGFR3: <ul style="list-style-type: none"> • Desarrollo de las extremidades. • Inhibición de la proliferación. | Peters et al., 1993 Leach et al., 1997 Harada et al., 2009 |

Tabla 2: Regulación transcripcional de la placa de crecimiento

| FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS | EXPRESIÓN | FUNCIÓN | DISPLASIA ASOCIADA | CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EN HUMANOS | REFERENCIAS |
|--------------------------------------|---|---|---|---|---|
| DLX5/DLX6 | Condrocitos hipertróficos. | Regulador positivo de la maduración de los condrocitos. | SHFM (Split-hand/splits-foot malformation) (MIM 183600) | Sindactilia del tercer y cuarto dedo. Pérdida de miembros superiores e inferiores. | Robledo et al., 2002 Ferrari y Kosher, 2002 Bendall et al., 2003 Chin et al., 2007 |
| RUNX2 RUNX3 | Condrocitos prehipertróficos e hipertróficos. | Maduración prematura de condrocitos mediante inducción de Colágeno X. Inductor de IHH en condrocitos prehipertróficos. | Displasia cleidocraneal (MIM 119600). | Talla moderadamente baja. Retraso de la maduración ósea. Hipoplasia o aplasia de las clavículas, <i>coxa vara</i> , <i>genu valgo</i> . Cierre tardío de las suturas craneales, paladar ojival y hendido, hipoplasia maxilar y malar. | Komori et al., 2006 Ueta et al., 2001 Mundlos et al., 1997 |
| SOX6 SOX5 | Desde pre-condrocitos hasta condrocitos proliferativos. | Inducción de la hipertrofia. Formación del esqueleto. Regulación de procesos como embriogénesis, gliogénesis, eritropoyesis y regulación de la cresta neural. | Craneosinostosis, translocación cromosoma 9 y 11 (MIM 218350). No hay displasias descritas hasta el momento asociadas a mutaciones en el gen <i>SOX5</i> . | Fusión prematura de huesos del craneo. Asimetría craneal y facial. Braquicefalea. Hipertelorismo. Hipoplasia media-facial. | Tagariello et al., 2006 Smits et al., 2004 |

| FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS | EXPRESIÓN | FUNCIÓN | DISPLASIA ASOCIADA | CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EN HUMANOS | REFERENCIAS |
|--------------------------------------|---|--|--|---|---|
| SOX9 | Células mesenquimales, condrocitos de reserva y proliferativos. | Formación del esqueleto y diferenciación de los testículos. Promotor de la condrogénesis temprana. Regulador de genes específicos de condrocitos: <i>Col2a1</i> , <i>Col11a2</i> , <i>CD-RAP</i> , <i>Acan</i> y <i>Hapln1</i> | Displasia campomélica (MIM 114290). | Curvatura y acortamiento de huesos largos. Sexo invertido. (Disgenesia gonadal) Dificultad respiratoria severa. | Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994 |
| SHOX | Todas las zonas de la placa de crecimiento. | Desarrollo esquelético Detención del ciclo celular y apoptosis. | Discondrosteosis de Léri-Weill (DLW, MIM 127300) Displasia mesomélica de Langer (DML, MIM 249700) | Talla baja. Acortamiento mesomélico las extremidades. Deformidad de Madelung. Talla baja. Acortamiento mesomélico y rizomélico. Aplasia o hipoplasia de peroné, cubito, radio y tibia. | Belin et al., 1998; Shears et al., 1998 |
| SHOX2 | Todas las zonas de la placa de crecimiento. | Desarrollo embrionario del paladar anterior. Desarrollo del esqueleto. Desarrollo embrionario del corazón. | No se ha descrito ninguna enfermedad humana asociada a SHOX2. | No se conocen. | Yu et al., 2005 Cobb et al., 2006 Blachske et al., 2007 |

4. SHOX

4.1. Gen

El gen *SHOX* (*Short stature homeobox-containing gene*, MIM 312865), localizado en la región pseudoautosómica 1 (PAR1) de los cromosomas sexuales X e Y (Rao et al., 1997; Ellison et al., 1997), codifica un factor de transcripción implicado en el desarrollo esquelético. La región PAR1 escapa de la inactivación del cromosoma X, por lo que todos los hombres y mujeres sanos presentan dos copias activas del gen. Está presente en la mayoría de los vertebrados a excepción de roedores, rana y conejo (Clement-Jones et al., 2000). Está formado por siete exones y genera dos transcritos mediante *splicing* alternativo, uno de 1870 pb, *SHOXa* y otro de 1349 pb, *SHOXb* (Rao et al., 1997), ambos poseen una región común, pero difieren en el último exón 6a ó 6b (Fig.5).

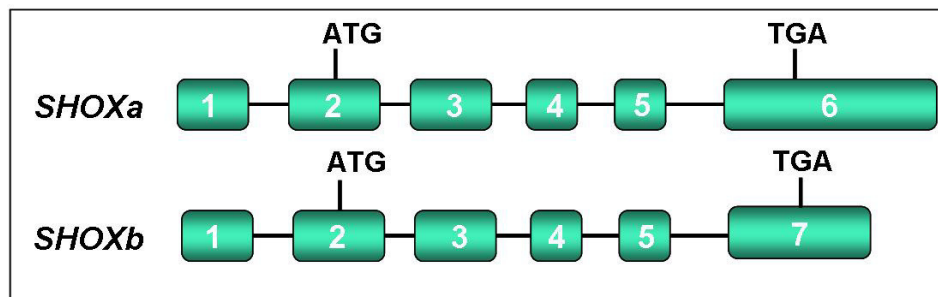


Figura 5. Estructura del gen *SHOX*. El gen *SHOX* está constituido por siete exones. Debido al *splicing* alternativo del último exón, se generan dos transcritos diferentes, *SHOXa*, que codifica la isoforma más larga, y *SHOXb* que codifica la isoforma corta.

4.2. Proteína SHOX

Los dos transcritos, *SHOXa* y *SHOXb*, dan lugar a dos isoformas diferentes, *SHOXa* de 292 aminoácidos y *SHOXb* de 225 aminoácidos (Rao et al., 1997). *SHOX* pertenece a la clase “*paired*” de la familia de proteínas homeodominio (Banerjee-Basu y Baxevanis, 2001). Algunas proteínas “*paired*” poseen además del homeodominio, el dominio OAR (*Otp*, *Aristaless*, *Rax*), que es el dominio de transactivación, lo que les permite ser transcripcionalmente activas. Las dos isoformas de *SHOX* poseen el homeodominio, pero sólo *SHOXa* contiene el dominio OAR (Fig.6). Este dominio, está compuesto por 14 aminoácidos, y se sitúa en la región C-terminal. La presencia del OAR, permite a *SHOXa* actuar como activador de la transcripción (Rao et al., 2001).

Por otra parte, el homeodominio está formado por 60 aminoácidos organizados en tres hélices, de las cuales, la primera está separada de las otras dos mediante una pequeña horquilla. Las hélices II y III conforman el motivo hélice-giro-hélice de unión al ADN, siendo la hélice III la que forma uniones específicas en la hendidura mayor del

ADN (Gehring et al., 1994; Wilson et al., 1995). La hélice III contiene una secuencia de señalización nuclear compuesta por cinco aminoácidos básicos no-clásicos (AKCRK), que permite la localización nuclear de la proteína (Sabherwal et al., 2004a; Sabherwal et al., 2004b). La presencia del homeodominio en la proteína SHOX le permite la unión a secuencias palindrómicas de ADN de tipo 5'-TAAT NNN ATTA-3', también conocida como elemento P3 (Rao et al., 2001). Además, la proteína SHOXa, gracias al homeodominio, se une al ADN formando homodímeros (Rao et al., 2001).

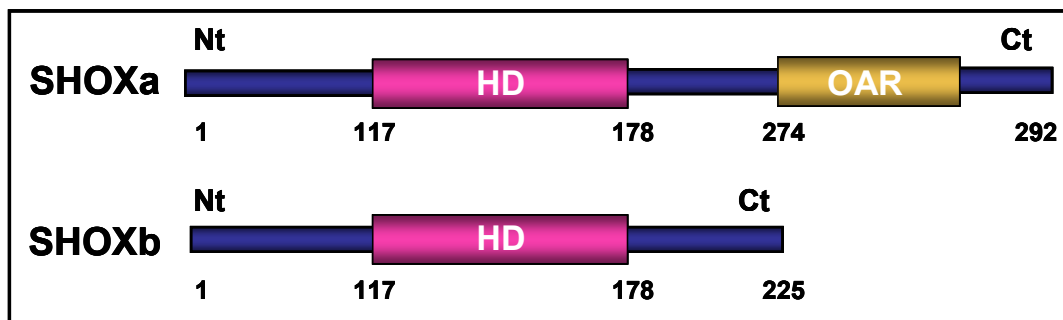


Figura 6. Estructura proteica de las dos isoformas de SHOX, SHOXa y SHOXb. Debajo de cada isoforma se indican los aminoácidos que limitan cada dominio. SHOXa es la isoforma activa por la presencia del dominio OAR mientras que SHOXb, al carecer de este dominio se considera transcripcionalmente inactiva. HD= homeodominio, OAR= dominio de transactivación.

4.3. Regulación de SHOX

Existen dos promotores del gen *SHOX*, uno de ellos se encuentra en el exón 1 (P1) y otro en el exón 2 (P2) (Blachske et al., 2003). Ambos promotores generan el mismo transcrito pero varían en su secuencia 5' UTR (*UnTranslated Region*), por lo que no se traducen con la misma eficacia (Blachske et al., 2003). Por una parte, el P2 genera un ARN mensajero (T2) con una secuencia 5' UTR corta, que presenta una alta capacidad de traducción, mientras que el P1, genera un transcrito (T1) con una estructura 5' larga y con menor capacidad de traducción (Blachke et al., 2003).

Otra forma de regulación de la transcripción de *SHOX* es mediante elementos *enhancer*, estos elementos reguladores son secuencias de ADN no codificantes conservadas entre especies (CNEs). Se han identificado siete elementos reguladores de la transcripción en las regiones distales del gen *SHOX*, cuatro de ellos se encuentran aguas abajo (Fukami et al., 2006; Sabherwal et al., 2007; Benito-Sanz et al., 2012) y tres aguas arriba del gen (Durand et al., 2010) (Fig.7).

La función de SHOX se regula mediante modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación. La Ser106 es un sitio de fosforilación que está localizado aguas arriba del homeodominio de SHOX. La fosforilación de la Ser106 es necesaria para que SHOX pueda activar la transcripción, regular el ciclo celular e inducir apoptosis (Marchini

et al., 2005). Este aminoácido no está presente en otras proteínas homeodominio de la clase “*paired*” por lo que representa un regulador específico en la función de SHOX. Se ha demostrado que el cambio de Ser por Ala afecta a la capacidad de la proteína para actuar como un activador transcripcional, y a la capacidad de inducir la detención del ciclo celular o apoptosis, estableciéndose un vínculo entre la transcripción y el control del ciclo celular de la proteína SHOX (Marchini et al., 2005).

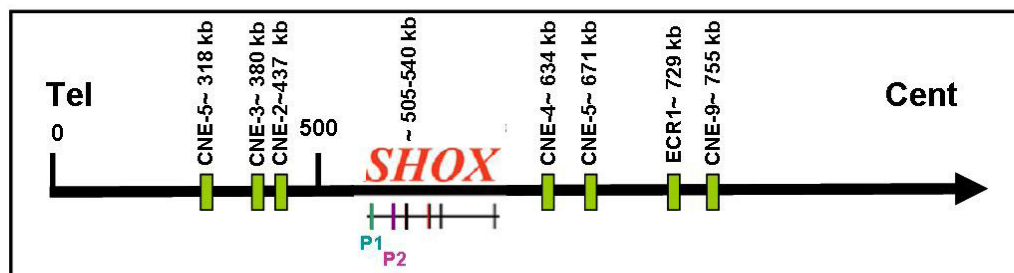


Figura 7. Representación esquemática de la localización genómica de *SHOX*, de sus *enhancers* y promotores. En el esquema se puede observar la localización aproximada de los *enhancers* con respecto al gen *SHOX*, la localización de los promotores y las coordenadas aproximadas en el cromosoma X.

4.4. Regulación de SHOX mediante HOX9

Recientemente se ha identificado a HOX9, miembro de la familia de proteínas HOX, como el primer factor de transcripción que es capaz de unirse a elementos reguladores de *SHOX* (Durand et al., 2012). Los ensayos de luciferasa y EMSA (Ensayo de retardo en la movilidad electroforética), han demostrado que HOX9 activa la expresión de *SHOX* en células U2OS mediante la unión a dos secuencias palindrómicas, localizadas dentro del promotor 2 (P2) de *SHOX* (Durand et al., 2012). En cambio, los ensayos de micromasa en pollo (ChMM), un sistema de cultivo *in vivo* que simula la osificación endocondral y el desarrollo de las extremidades, revelaron una regulación negativa de *Shox* mediada por Hox9 en el mismo sitio de unión que HOX9 se unía a SHOX en células humanas U2OS (Duran et al., 2012).

Los genes *HOX* codifican una familia de factores de transcripción que juegan un papel fundamental durante la formación y desarrollo de las extremidades (McGinnis et al., 1992). Todas las proteínas HOX comparten un homeodominio altamente conservado capaz de reconocer la misma secuencia consenso de ADN (Svingen et al., 2006). La función de cada proteína HOX viene dada por la capacidad de unirse a otros cofactores. Dependiendo de los cofactores a los que activen y las vías de señalización en diferentes tejidos, hace que HOX actúe como activador o represor de la transcripción de diferentes genes (Mello et al., 1999; Svingen et al., 2006).

4.5. Cofactores de SHOX

Se han identificado tres proteínas que interaccionan con SHOX: SOX5, SOX6 (Aza-Carmona et al., 2011) y MAGED1 (datos no publicados), mediante ensayos de doble híbrido de levaduras y estudios de coimmunoprecipitación en células humanas HEK293.

4.5.1. SOX5 y SOX6

SOX5 (L-SOX5) y SOX6 son factores de transcripción que participan en la condrogénesis (Akiyama et al., 2002). Pertenecen al subgrupo D de las proteínas SOX (Sry-type HMG box) (Wegner et al., 1999). Ambas proteínas presentan tres dominios proteicos en su estructura: dos dominios “*coiled coil*”, que les permiten homo- y heterodimerizar entre ellas, y un dominio de unión al ADN, el dominio HMG (“*high mobility group*”) (Wismuller et al., 2006) (Fig.8). La similitud entre las dos proteínas es de un 93% de identidad. Debido a que SOX5 y SOX6 carecen de un dominio de transactivación, no son capaces por sí mismos de activar la transcripción de otros genes, por lo que se unen a SOX9, formando el trío de SOX, induciendo así a genes específicos de cartílago (Akiyama et al., 2001; Noguchi et al., 2010).

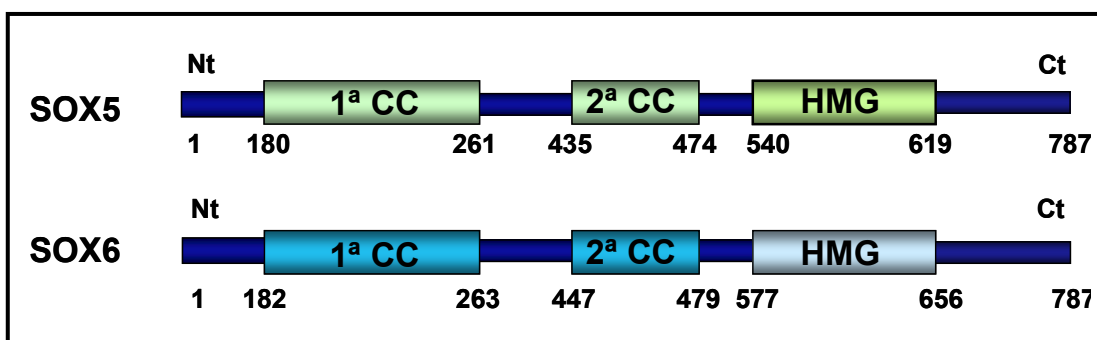


Figura 8. Estructura proteica de SOX5 y SOX6. En la imagen se observan los diferentes dominios de SOX5 y SOX6. Debajo del esquema de cada proteína están indicados los aminoácidos que limitan cada dominio. CC= dominio *coiled coil*, que les permite homo- y hetero-dimerizar y el HMG:=dominio *high mobility group* que les permite unirse al ADN.

El patrón de expresión de ambas proteínas se encuentra solapado en muchos tejidos, siendo detectable durante la condensación precartilaginosa y la osificación endocondral (Lefebvre et al., 1998). Su expresión en ratón está localizada en los condrocitos de reserva y proliferativos, estando ausente en condrocitos prehipertróficos e hipertróficos (Lefebvre et al., 1998), mientras que en humanos, SOX5 y SOX6 se expresan en todos los condrocitos de la placa de crecimiento (Aza-Carmona et al., 2011).

Los ratones *knock-out* tanto para Sox5 como para Sox6 muestran defectos esqueléticos al nacimiento (Smits et al., 2001). Los ratones Sox5^{-/-} presentan hendidura en el paladar secundario y acortamiento de las costillas, mientras que los ratones Sox6^{-/-} presentan curvatura del esternón. En ambos casos, mueren después del nacimiento por problemas respiratorios, sin embargo, el doble *knock-out* de Sox5 y Sox6 presenta defectos esqueléticos severos y muere por fallo cardíaco en el embrión sobre la E16.5 (Smits et al., 2001).

Mediante el ensayo del doble híbrido de levaduras se determinó que es el homeodominio la región de SHOX que interacciona con SOX5 y SOX6 y el HMG, el dominio de SOX6 que interacciona con SHOX (Aza-Carmona et al., 2011). Los ensayos con mutaciones localizadas a lo largo de los diferentes dominios de SHOX, demostraron, que las mutaciones localizadas en el homeodominio de la proteína, reducen la capacidad de interacción con SOX6 (Aza-Carmona et al., 2011).

4.5.2. SOX9 y el trío de Sox

El tercer componente del ya mencionado trío de SOX, es SOX9. SOX9 pertenece al subgrupo E de las proteínas SOX que además de contener el dominio de unión al ADN (HMG) en la región N-terminal, posee un potente dominio de transactivación en la región C-terminal (SPQ), lo que le hace ser transcripcionalmente activa (Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994; Südbek et al., 1997) (Fig.9).

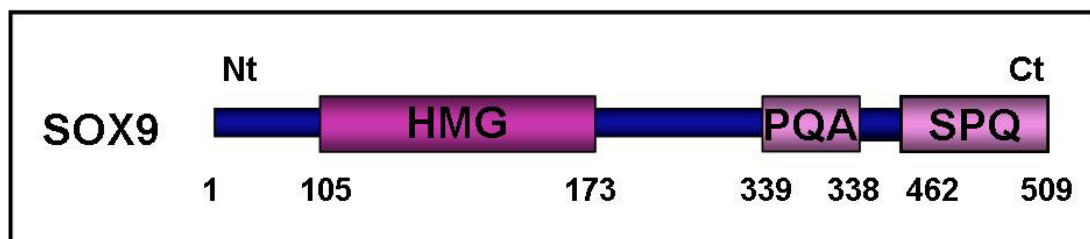


Figura 9. Estructura de la proteína de SOX9. En el esquema se pueden observar los dominios de SOX9. Debajo del esquema de la proteína se marcan los aminoácidos que limitan cada dominio. HMG= *high mobility group* que le permite unirse al ADN, PQA= compuesto por 41 aminoácidos que contiene únicamente prolina, glutamina y alanina, cuya función es desconocida, SPQ= dominio de transactivación que contiene serina, prolina y glutamina.

Las primeras pruebas de la implicación de SOX9 en patología humana fueron obtenidas por dos grupos independientes que identificaron mutaciones en SOX9 en pacientes con displasia campomélica, caracterizada por una curvatura y acortamiento simétrico de los huesos largos y disgenesia gonadal 46, XY (MIM 278850, Kuhnle et al., 1993) descrita en un niño y, caracterizada por alteraciones en los genitales en aproximadamente 2/3 de los individuos afectados (Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994).

Estudios posteriores con ratones modificados genéticamente, demostraron que Sox9 inicia y promueve la condrogénesis temprana, pero suprime el estado de maduración (Bi et al., 1999; Akiyama et al., 2002; Akiyama et al., 2004). Su patrón de expresión comienza en las células osteoprogenitoras y se extiende hasta que los condrocitos alcanzan la hipertrofia (Zhao et al., 1997).

Sox9 reconoce secuencias heptaméricas de ADN de tipo (A/T) (A/T)CAA(T/A)G y regula directamente a genes específicos de condrocitos durante el desarrollo del cartílago. Además Sox9 coopera con L-Sox5/Sox6 en la activación de genes específicos de condrocitos tales como: *Col2a1* (Lefebvre et al., 1998), *Acan* (Han y Lefebvre., 2008), *Comp* (Liu et al., 2007), *S100A1* y *S100B* (Saito et al., 2007), *MATN1* (Nagy et al., 2010), y miR-140 (Yamashita et al., 2012). Entre ellos nos referiremos a *Col2a1* y *ACAN* por estar relacionados en la presente Tesis doctoral.

El colágeno de tipo II está codificado por el gen *COL2A1* y es un componente importante de la matriz extracelular. Mutaciones en dicho gen son causantes de varias displasias esqueléticas: síndrome de Stickler de tipo II (MIM 604841, Stickler et al., 1965; Spranger y Wiedemann, 1966), displasia congénita espondiloepifisaria (MIM 183900, Anderson et al., 1990) y acondrogénesis de tipo II (MIM 200610, Spranger et al., 1974). Estudios llevados a cabo por Lefebvre y col., en 1996, demostraron que Sox9 se une a una secuencia de 48 pb localizada en el primer intrón de *Col2a1* para activarlo. Transfecciones independientes con Sox9 y L-Sox5 ó Sox6, producían un leve incremento de la expresión del *Col2a1* endógeno, mientras que cotransfecciones con el trío de Sox, incrementaban de manera considerable los niveles de expresión de *Col2a1* (Lefebvre et al., 1998).

El agrecano es el mayor componente de la matriz extracelular del cartílago. El gen que codifica esta proteína es *ACAN* y mutaciones en dicho gen son responsables de tres displasias esqueléticas: osteocondritis (MIM 165800, Zellweger y Ebnother, 1951), displasia espondiloepimetafisaria (MIM 612813, Tompson et al., 2009) y displasia espondiloepimetafisaria de Tipo Kimberley (MIM 608361, Anderson et al., 1990). Se ha visto que el trío de Sox activa el *enhancer* de *Acan* y la unión de los cofactores, L-Sox5/Sox6, es necesaria para su transactivación a través de Sox9 (Han y Lefebvre, 2008).

4.5.3. MAGED1 (Melanoma antigen D1)

MAGED1 (*Melanoma antigen D1*), homólogo humano de NRAGE en rata y de Dlxin-1 en ratón, es un miembro de la familia MAGE constituida hasta el momento por 25 miembros conocidos (Barker y Salehi, 2002). La proteína MAGED1 contiene tres dominios (Fig.10): MHD2 (dominio de homología MAGE) es común a los miembros de la

sub-familia MAGE-D, cuya función es hasta el momento desconocida; IRD (*Interspersed repeat domain*), es un dominio de repeticiones entremezcladas del hexapéptido WQXPXX, exclusivo de la proteína MAGED1, el cual está involucrado en la interacción con otras proteínas, y finalmente, el NHD (dominio de homología con NECDIN), presente en todos los miembros de las proteínas MAGE, y es el dominio implicado en la interacción con otras proteínas (Barker y Salehi, 2002).

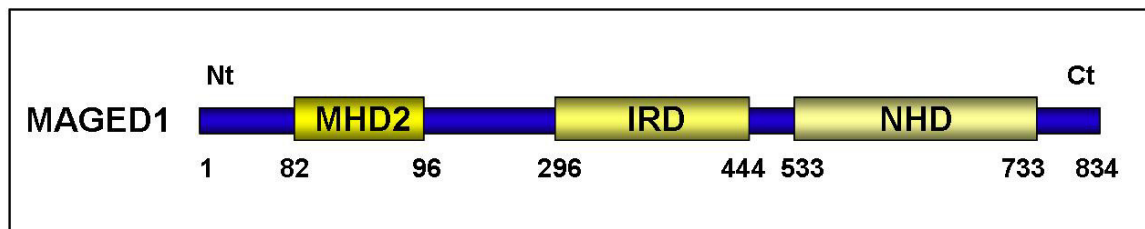


Figura 10. Estructura de la proteína MAGED1. La proteína MAGED1 contiene tres dominios: MHD2,=dominio de homología MAGE; IRD=dominio de repeticiones entremezcladas; NHD=el dominio de homología con necdin. Los aminoácidos de cada dominio están indicados debajo de la estructura.

MAGED1 es capaz de asociarse a otras proteínas formando una estructura multiproteica y regular la transcripción de otros genes (Masuda et al., 2001). De hecho, interacciona con los factores de transcripción de la familia homeodominio Dlx5 y Msx2, activando su función transcripcional (Masuda et al., 2001). Tanto Dlx5 como Msx2 inducen la diferenciación de los condrocitos de la placa de crecimiento (Ferrari y Kosher, 2002; Bendall et al., 2003; Amano et al., 2008) e interaccionan con MAGED1 a través del IRD (Masuda et al., 2001; Kuwayima et al., 2004) implicándola en la regulación de la placa de crecimiento. Pero MAGED1 también juega un papel importante en la regulación de la progresión del ciclo celular y apoptosis por su interacción, entre otras, con la proteína Che-1 (Grazia Di Certo et al., 2007).

4.6. Dianas transcripcionales de *SHOX*

Actualmente existen tres dianas transcripcionales conocidas de *SHOX*: *NPBB* (*Natriuretic Peptide Precursor B*) (Marchini et al., 2007), *ACAN* (*Agreccan*) (Aza-Carmona et al., 2011) y *FGFR3* (*Fibroblast growth factor receptor 3*) (Decker et al., 2011).

En 2007, Marchini y col., identificaron la primera diana transcripcional del gen *SHOX*, el gen *NPPB*, que codifica la proteína BNP (*Brain Natriuretic Peptide*). BNP es una hormona conocida principalmente por su función cardiovascular y constituye un biomarcador para el diagnóstico y pronóstico cardíaco (Suzuki et al., 2004; Kragelund et al., 2005). Sin embargo, defectos en heterocigosis en el receptor *NPR-B* han sido

descritos en talla baja idiopática, y su pérdida de función en homocigosis causa displasia acromesomélica tipo Maroteaux (MIM 602875, Maroteaux et al., 1971). Se ha demostrado que SHOX transactiva el promotor de *NPBB* mediante su unión al flanco 5' del mismo. Además, se observó que SHOX y BNP están colocalizados en las mismas zonas de la placa de crecimiento epifisaria (Marchini et al., 2007).

Otra diana transcripcional de *SHOX* descrita por Decker y col., es el gen *FGFR3* que codifica el receptor del factor de crecimiento fibroblástico 3 (Eswarakumar et al., 2006). Se ha descrito que mutaciones de ganancia de función en *FGFR3* están asociadas a enfermedades esqueléticas como son, acondroplasia (MIM 100800, Chiari et al., 1913), hipocondroplasia (MIM 146000, Walker et al., 1971) y displasia tanatofórica (MIM 187600, Chou et al., 2009). Se ha demostrado que SHOX es un potente regulador positivo de *FGFR3* en líneas celulares de osteosarcoma y en fibroblastos, mientras que Shox reprime la expresión de *FGFR3* en sistemas de micromasa de pollo (Decker et al., 2011).

Otra diana transcripcional de *SHOX*, descrita por nuestro grupo es *ACAN* (Aza-Carmona et al., 2011). Se describió que SHOX, cooperando con los factores de transcripción SOX5, SOX6 y SOX9 es capaz de activar el *enhancer* de *ACAN* en células U2OS (Aza-Carmona et al., 2011).

4.7. Expresión de SHOX

La expresión de las proteínas SHOXa y SHOXb es diferencial. La expresión de SHOXa es mucho más generalizada encontrándose en corazón, músculo esquelético, placenta, páncreas, hígado y hueso, mientras que SHOXb se expresa en riñón fetal, hueso y músculo esquelético (Ellison et al., 1997; Rao et al., 1997).

La proteína SHOXa se expresa en la placa de crecimiento humana desde la semana 12 de gestación hasta que se fusiona tras finalizar la etapa de crecimiento puberal (Munns et al., 2004). Se expresa en todos los tipos de condrocitos, pero no en osteoblastos y osteoclastos (Marchini et al., 2004; Munns et al., 2004). Entre la semana 12 y 38 de gestación, SHOXa se expresa con la misma intensidad en todos los condrocitos de la placa de crecimiento, tanto en condrocitos de reserva como proliferativos e hipertróficos (Munns et al., 2004; Aza-Carmona et al., 2011). En cambio durante la infancia, SHOXa se expresa con mayor intensidad en los condrocitos hipertróficos, disminuyendo su intensidad en el resto de las zonas (Marchini et al., 2004; Munns et al., 2004).

La expresión de SHOXa se encuentra localizada en la porción media de las extremidades tanto superiores como inferiores, comenzando en el pericondrio y en el

mesénquima condensado y posteriormente en la región distal de húmero/cúbito/radio y en la muñeca (Hall et al., 1990; Clement-Jones et al., 2000).

La expresión de SHOXa no solo está asociada al desarrollo de las extremidades, sino que también está implicada en el desarrollo del primer y del segundo arco faríngeo, manifestándose desde el CS15 hasta el CS2 (Clement-Jones et al., 2000).

5. PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL GEN *SHOX*

Alteraciones en el gen *SHOX* o en sus secuencias reguladoras localizadas en las regiones 3' y 5' del gen, han sido asociadas con dos displasias esqueléticas: la discondrosteosis de Léri-Weill (DLW) y la displasia mesomélica de Langer (DML). Asimismo, han sido identificadas en una pequeña proporción de pacientes, con talla baja idiopática (TBI).

5.1. Discondrosteosis de Léri-Weill

La discondrosteosis de Léri-Weill (DLW, MIM 127300) es una displasia esquelética caracterizada por una talla baja disarmónica, acortamiento de la región mesomélica de las extremidades (antebrazo y pantorrilla) y la deformidad de Madelung. La deformidad de Madelung es una anomalía del desarrollo del radio distal y del carpo (Madelung, 1879) caracterizada por un acortamiento del antebrazo junto con una curvatura del radio y una hipoplasia distal del cúbito que genera una movilidad limitada de la muñeca (Fig 11).



Figura 11. Deformidad de Madelung. En la imagen de la izquierda podemos observar la deformidad de Madelung, caracterizada por una hipoplasia del cúbito distal y de la muñeca. La imagen de la derecha muestra una radiografía donde se aprecia con mayor claridad la curvatura del radio.

La altura media de los pacientes con DLW es de -2.2 desviaciones estándar (DE), con un intervalo entre -4.6 DE y +0.6 DE (Ross et al., 2001). El fenotipo asociado a ésta enfermedad es heterogéneo, puesto que la talla de algunos pacientes se encuentra dentro del rango normal (-2 DE y +2 DE) y no todos presentan la deformidad de Madelung (Ross et al., 2001).

Se pueden observar otras características auxológicas en algunos individuos afectados con DLW, como engrosamiento de los huesos largos, anormalidades del cuello anatómico del húmero, protuberancias de la tibia, acortamiento y engrosamiento de las falanges y metacarpios (principalmente del 4º y 5º metacarpio), coxa valga, cubitus valgus, escoliosis y paladar hendido (Binder et al., 2011).

La prevalencia inicial de la DLW en la población fue estimada en 1:2000, pero estudios mas recientes han estimado que la prevalencia actual en la población es de 1:1000 (Nicolosi et al., 2010). Hasta el momento, se ha descrito que un ~70% de los casos de DLW están asociados a alteraciones en heterocigosis en el gen *SHOX* o en sus secuencias reguladoras (Belin et al., 1998; Shears et al., 1998; Benito-Sanz et al., 2006; Chen et al., 2009).

5.2. Displasia mesomélica de Langer

La displasia mesomélica de Langer (DML, MIM 249700) representa la forma clínica más severa de la DLW, debido a la presencia de alteraciones en homocigosis o heterocigosis compuesta del gen *SHOX* ó de la región 3' del mismo (Belin et al., 1998; Campos-Barros et al., 2007; Bertorelli et al., 2007). Cursa con una talla baja severa de -6.2 DE de media, acortamiento mesomélico y rizomélico de las extremidades, aplasia o hipoplasia severa de peroné y cúbito, curvatura de radio y tibia e hipoplasia de la mandíbula (Fig.12).



Figura 12: Fotografías de neonato y madre afectados con DML. En la fotografía podemos observar el acortamiento excesivo de los miembros superiores (Imagen de Shears et al., 2002).

5.3. Talla baja idiopática

La TBI (MIM 300582) engloba a un grupo heterogéneo de pacientes que

presentan talla baja sin defecto molecular conocido. La última definición dada por consenso sobre la TBI, la define como la talla que se encuentra por debajo de -2 DE de la media para edad, sexo y grupo demográfico y que no presenten problemas endocrinos, sistémicos, nutricionales o anomalías cromosómicas (Cohen et al., 2008).

Aproximadamente, el 2-5% de los pacientes con TBI presentan algún tipo de alteración en el gen *SHOX* o en sus *enhancers* en el flanco distal 3' y 5' (Rao et al., 1997; Rappold et al., 2002; Binder et al., 2003; Benito-Sanz et al., 2005; Benito-Sanz et al., 2006; Benito-Sanz et al., 2012).

6. SHOX2

6.1. Gen y proteína

El gen *SHOX2* está localizado en el cromosoma 3q25-q26 (Semina et al., 1998). Está compuesto por seis exones y presenta dos transcritos distintos, *SHOX2a* de 1948 pb y *SHOX2b* de 1541 pb (Blaschke et al., 1998) (Fig.13). *SHOX2* está muy conservado y está presente en todas las especies de vertebrados a excepción del perro (Clement-Jones et al., 2000).

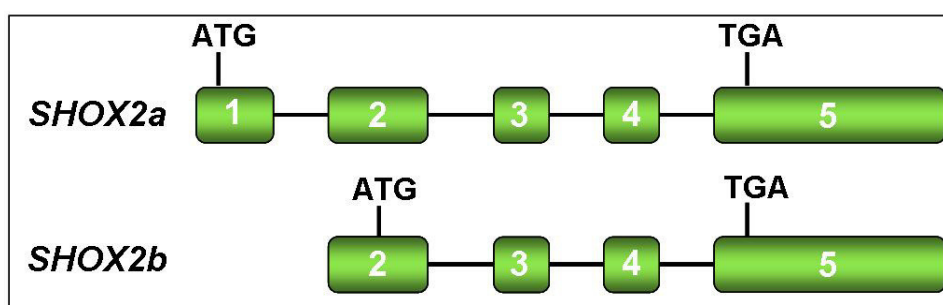


Figura 13. Estructura génica de *SHOX2*. El gen *SHOX2* está constituido por cinco exones y dos codones de inicio que dan lugar a dos transcritos distintos. *SHOX2a* codifica para la isoforma larga de la proteína *SHOX2a*. El segundo transcrito codifica para la isoforma corta *SHOX2b*.

SHOX2a y *SHOX2b* codifican dos isoformas, *SHOX2a* y *SHOX2b*, de 331 y 190 aminoácidos respectivamente, que se diferencian únicamente en el extremo N-terminal (Fig.14) (Blaschke et al., 1998). Ambas isoformas presentan el homeodominio, HD y el dominio de transactivación, OAR, lo que les hace ser transcripcionalmente activas, a diferencia de *SHOXb*, que carece de este dominio (Fig.14). *SHOX* y *SHOX2* presentan un idéntico homeodominio y un 83% de homología a nivel de proteína (Blaschke et al., 1998; Semina et al., 1998).

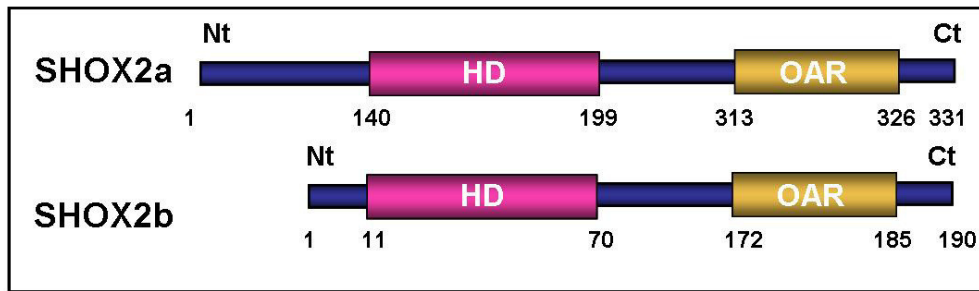


Figura 14. Estructura proteica de las dos isoformas de SHOX2: SHOX2a y SHOX2b. Debajo de cada isoforma se indican los aminoácidos que contiene cada dominio. Ambas isoformas difieren únicamente en la región N-terminal. HD= homeodominio, OAR= dominio de transactivación.

6.2. Expresión

Se ha visto expresión de SHOX2 en diferentes tejidos como: corazón, músculo esquelético, hueso, fibroblastos de médula ósea, paladar, hígado, pulmón, páncreas y placenta (Blaschke et al., 1998).

6.2.1. Expresión de SHOX2 en hueso

La expresión de *SHOX2* se detecta en las extremidades superiores hacia la región media y proximal a partir del CS13. Los estudios en ratón, demuestran que la expresión de *Shox2* aparece en diferentes etapas del desarrollo comenzando en el E9.5 con una fuerte expresión en el mesénquima de las yemas de las extremidades. En el E10, la yema comienza a elongarse y su aparición se limita a la región proximal del mesénquima, en el E11.5 *Shox2* se localiza en la región proximal del cartílago que dará lugar al zeugopodio. En el momento de diferenciación de los condrocitos hipertróficos, E13.5 y 14.5, su expresión está localizada en la porción central y en los condrocitos proliferativos del estilopodio al igual que en el pericondrio y en los alrededores del tejido conectivo de los elementos cartilaginosos (Yu et al., 2007).

Estudios recientes llevados a cabo por Bobick y Cobb, 2012, han demostrado que los ratones *knock-out* condicionales de *Shox2* durante el desarrollo de condrocitos, muestran un acortamiento rizomélico de las extremidades. Este patrón de expresión implica a *Shox2* en la regulación de la progresión de la condrogénesis en dos estadios diferentes, por una parte, en la diferenciación temprana y en la transición de la maduración de los condrocitos y por otra, en la entrada de los condrocitos en hipertrofia (Bobick y Cobb, 2012).

Los estudios llevados a cabo en embriones humanos, han demostrado que el patrón de expresión de SHOX y de SHOX2, se encuentra solapado en las extremidades en desarrollo (Clement-Jones et al., 2000).

6.2.2. Expresión de SHOX2 en corazón

Además de su función en crecimiento, SHOX2 desempeña un papel crucial en el desarrollo del corazón. Mediante hibridaciones *in situ* se observó que *Shox2* comienza a expresarse en el E8.5 en la región posterior del tubo cardiaco primitivo y se expande en el E11.5, hacia el nodo-sinatrial (SAN) y la válvula venosa (Blaschke et al., 2007). Análisis de embriones en diferentes estados de desarrollo, demuestran que los ratones *knock-out* para *Shox2* son incompatibles con la vida y mueren entre el E11.5-13.5 (Blaschke et al., 2007).

En el desarrollo del corazón, concretamente en el desarrollo del SAN, también se ha observado redundancia funcional entre SHOX y *Shox2*. El grupo de Liu y col., en 2012, generaron un ratón *knock-in*, reemplazando la secuencia codificante de *Shox2* por la de SHOX. Observaron que la expresión de SHOX desempeña funciones similares a la de *Shox2*, mostrando el mismo efecto represor que ejerce *Shox2* sobre la acción de *Nkx2.5* tanto *in vivo* como *in vitro*. Por ello se puede afirmar que SHOX sustituye a *Shox2* en la regulación del SAN mediante la represión transcripcional del promotor de *Nkx2.5* (Liu et al., 2012).

6.2.3. Expresión de SHOX2 en paladar

Además de estar implicado en el desarrollo y en la formación del corazón, *Shox2* participa también en la formación del paladar y en la dentadura (Yu et al., 2005). Deficiencias en *Shox2* provocan una formación incompleta en la región anterior del paladar secundario (Yu et al., 2005).

6.3. Función

6.3.1. Función de SHOX2 en el desarrollo del esqueleto

Shox2 interviene en la maduración de los condrocitos del estilopodio regulando el paso de condrocito proliferativo a hipertrófico (Cobb et al., 2006; Yu et al., 2007). Partiendo de esta base, se estudió la expresión de genes que juegan un papel importante durante la maduración de los condrocitos y la función que ejerce *Shox2* sobre estos genes. Entre ellos destacamos, *Ihh*, *Pthrp*, *Runx2* y *Runx3*, *Bmp4* y *Hoxa11* y *Hoxd11* (Cobb et al., 2006; Yu et al., 2007; Gross et al., 2012).

Estudios en ratones *Shox2*^{-/-} permitieron establecer una relación entre la *Ihh*, *Pthrp* y *Shox2*. Durante el E12.5, la expresión de *Ihh* en el estilopodio es prácticamente inexistente mientras que su expresión en el zeugopodio permanece normal, mostrando que *Shox2*, juega un papel específico en el mantenimiento de la expresión de *Ihh* en el estilopodio (Cobb et al., 2006; Yu et al., 2007). Además, en este mismo estadio, E12.5, cuando la expresión de *Ihh* está reducida en el estilopodio de ratones *Shox2*^{-/-}, la

expresión de *Pthrp* es normal en esta región, sugiriendo que la expresión residual de *Ihh* en el estilopodio es suficiente para mantener la expresión de *Pthrp*, ya que la PTHrP desempeña un papel crítico en la regulación de los condrocitos hipertróficos (Yu et al., 2007).

Se observó la expresión de *Runx2* y *Runx3*, dos miembros de la familia *Runx*, en el desarrollo del estilopodio en dichos ratones *Shox2*^{-/-}. La expresión de *Runx2* y *Runx3* en embriones normales, se detecta en la parte central de la placa de crecimiento y en los condrocitos prehipertróficos e hipertróficos tempranos entre los estadios E11.5 y E13.5. En cambio, en embriones *Shox2*^{-/-}, la expresión de *Runx2* y *Runx3* en los condrocitos del estilopodio, está drásticamente reducida o es prácticamente indetectable en estos mismos estadios (Yoshida et al., 2004; Yu et al., 2007). Debido a que *Bmp4* está expresado en la condensación de los condrocitos del estilopodio y zeugopodio durante estos mismos estadios, se confirmó que *Shox2* regula la expresión de *Runx2* a través de la represión de *Bmp4* (Yu et al., 2007).

Finalmente, miembros de la familia *Hox*, *Hoxa11* y *Hoxd11*, regulan los primeros pasos de la diferenciación de los condrocitos actuando aguas arriba de *Shox2* y *Runx2* (Gross et al., 2012).

6.3.2. Función de SHOX2 en el desarrollo del corazón

En corazón, *Shox2* juega un papel fundamental en la formación del seno venoso y en la regulación del desarrollo del nodo-sinoatrial (Blaschke et al., 2007). Su implicación en el seno venoso se vio en ratones *knock-out* de *Shox2* ya que morían durante el desarrollo embrionario por defectos cardíacos (Yu et al., 2005; Blaschke et al., 2007). Su implicación en la regulación del desarrollo del SAN se produce mediante la represión transcripcional de la expresión de *Nkx2.5* (Blaschke et al., 2007; Liu et al., 2012). La actividad de *Nkx2.5* es perjudicial en el desarrollo normal del SAN, por lo que *Shox2*, reprime de manera indirecta la actividad del promotor de *Nkx2.5* para su correcta formación y desarrollo (Espinoza-Lewis et al., 2009; Liu et al., 2012).

6.3.3. Función de SHOX2 en el desarrollo del paladar

Existen varios genes que están implicados en el desarrollo del paladar anterior, entre los que destacan, *Msx1* (*Muscle segment homeobox*), *Shh* (*Sonic hedgehog*), *Bmp2*, *Bmp4*, *Fgf10*, *Osterix* y *Shox2*. Se ha visto que mutaciones en *Msx1* o *Fgf10* son responsables de hendiduras en el paladar (Yu et al., 2005). Se conoce que *Shox2* inhibe la expresión de *Fgf10* y *Fgfr2c* en el mesénquima del paladar, de modo que *Fgf10* inhibe la proliferación celular en el paladar anterior en ratones *knock-out* de *Shox2* (Yu et al., 2005).

La expresión de *Osterix*, gen esencial en la diferenciación de los osteoblastos y la formación del hueso (Nakashima et al., 2002), se solapa con la expresión de *Runx2* durante la formación del paladar. Debido a que la expresión de *Shox2* no solapa con la de estos genes, se llegó a la conclusión de que *Shox2* no regula directamente la expresión de *Runx2* y *Osterix*, sino que es necesaria la represión de *Bmp2* para la activación de ambos genes (Yu et al., 2007; Gu et al., 2008).

6.4. Patologías asociadas a alteraciones en el gen *SHOX2*

Hasta el momento no hay ninguna enfermedad asociada a defectos de *SHOX2*.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

La alta homología existente entre SHOX y SHOX2, nos llevó a plantear la posibilidad de que SHOX2 podría compartir con SHOX, las mismas dianas transcripcionales y presentar la capacidad de unirse a los mismos cofactores de SHOX, siendo, SOX5, SOX6 y MAGED1. La identificación y caracterización de las proteínas que interaccionan con SHOX2, nos permitirá, por primera vez, establecer una nueva forma de regulación en la que SHOX2 estaría implicado formando complejos multiproteicos que ayudarán a la regulación de genes específicos el cartílago.

Aproximadamente el 70% de los pacientes con DLW presentan alteraciones en el gen *SHOX* o sus *enhancers*, y de los cuales una pequeña proporción, son mutaciones puntuales. La identificación y caracterización de nuevas mutaciones puntuales del gen *SHOX*, nos permitirá entender mejor la función de SHOX en el crecimiento humano.

OBJETIVOS

CAPÍTULO 1

1. Identificación de las proteínas que interaccionan con SHOX2
2. Caracterización de las proteínas que interaccionan con SHOX2
3. Identificación de las dianas transcripcionales de *SHOX2*
4. Análisis mutacional del gen *SHOX2* y de los genes que codifican las proteínas que interaccionan con SHOX2, en pacientes con discondrosteosis de Léri-Weill (DLW) sin defecto molecular conocido

CAPÍTULO 2

1. Identificación y caracterización de la primera mutación fundadora, p.A170P en el gen *SHOX*

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CONSTRUCCIONES

1.1. ADNc

Los ADNc utilizados para generar las construcciones de la presente Tesis Doctoral se han obtenido de distintas formas:

- SHOXa: clon donado por el Dr. Peter Scambler, correspondiente a la secuencia NM_000451.
- SHOX2a: clon similar a la secuencia NM_006884 obtenido por la eliminación de una región de 70 pb del clon IMAGE4122010 (Imágenes).
- MAGED1: clon comercial ID IMAGp958O15856Q2 (Imágenes) correspondiente a la secuencia NM_001005333.
- SOX5: clon donado por el Dr. S. Ikewaga, correspondiente a la isoforma B de L-SOX5, secuencia NM_152989.
- SOX6: clon donado por el Dr. T. Ikeda, correspondiente a una variante de *splicing* sin el exón 9 y con el exón 14a, que representa la isoforma predominante en condrocitos (comunicación personal del Dr. Ikeda).

1.2. Vectores de expresión

Para la expresión de las proteínas en células humanas se han utilizado los vectores pcDNA3-HA y pcDNA3-FLAG (Invitrogen). Para los ensayos de colocación *in vivo* en células humanas se han usado los vectores pEGFP-C1 y pDsRED2-C1 (Clontech). Para los ensayos de doble híbrido de levaduras se han empleado los vectores pGBT9 y pACT2 (Clontech). Para los ensayos de luciferasa se han empleado los vectores pGL3-Basic, pGL3-Promoter, pRL-TK (Promega), p89Luc-ACAN (4xA1) y p89Luc-Col2a1enhancer (donado por Dra. Veronica Lefebvre).

1.3. Clonación

El primer paso consiste en amplificar mediante PCR los ADNc con los que queremos trabajar, e introducir sitios de restricción en los extremos de la secuencia empleando oligonucleótidos que los contenga. Las condiciones de PCR usadas son: 1X AmpliTaq Buffer, 2U de AmpliTaq Polimerasa (Applied Biosystems), 1,5-2mM MgCl₂, 200μM dNTPs (Sigma), 400nM de cada oligonucleótido (Roche) y 100 ng de plásmido que contiene el ADNc de interés. Las condiciones de amplificación son: 95°C de desnaturalización durante 10 minutos y 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 53-57°C durante 30 segundos-1 minuto y 72°C durante 1-2 minutos, con una extensión final de 8 minutos a 72°C.

El segundo paso sería la ligación, es decir, la introducción del ADNc amplificado en el vector pCR.2.1 utilizando el kit "TA cloning Dual promoter" (Invitrogen). Para ello se carga completamente la muestra de PCR en un gel de 0,8% de agarosa y se separa mediante electroforesis. El fragmento se purifica empleando el kit "Gel extraction spin kit" (Genomed) y posteriormente se cuantifica. Este fragmento se liga con el vector pCR.2.1 usando la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen). La mezcla de ligación se incuba durante toda la noche a 14°C.

Al día siguiente, se lleva a cabo la transformación en una cepa de células competentes H10 (Promega). A 50 µl de células se le añaden 2-5 µl de la mezcla de ligación, tras estar incubando durante 30 minutos en hielo se someten a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Seguidamente, las células se incuban durante una hora a 37°C en agitación, pasado este tiempo se siembran en placas de LB (triptona 1% - Panreac, extracto de levadura 0,5% - Panreac, NaCl 1% - Sigma, Mg₂SO₄ 0,25% - SIGMA) con agar al 1,5% (Panreac), a estas placas se les añade el antibiotico respectivo en función del tipo de vector, en éste caso se añade ampicilina 50 µg/ml (Sigma).

Las placas se dejan incubando a 37°C durante toda la noche, al día siguiente se seleccionan algunas de las colonias que han crecido en la placa y se vuelven a dejar crecer en 8 ml de LB con ampicilina 100 µg/ml durante toda la noche. Finalmente, el plásmido se purifica empleando el kit "Miniprep" (Genomed), se carga la muestra en un gel de agarosa y se separa mediante electroforesis. Una vez finalizada la purificación, y para poder comprobar que no ha habido ningún error en la secuencia original, se secuencian los plásmidos con "BigDye Terminator V3.1" (Applied Biosystems) y secuenciándolas en el secuenciador ABI 31730XL (Applied Biosystems). Los resultados se analizan con el programa "Sequencher 5.10" (Gene Codes).

El último paso es la subclonación del ADNc en el vector de interés, para ello se requieren enzimas que reconozcan los sitios de restricción en el vector de interés y en los extremos del ADNc clonado. Después se procede a la digestión del fragmento de interés clonado en el vector pCR.2.1 y del vector donde queremos introducir el fragmento. Se separan los fragmentos en un gel de agarosa y se purifica el fragmento empleando el kit "Gel extraction spin kit". Posteriormente, se prepara la mezcla de ligación con una proporción inserto-vector 10:1 respectivamente, usando de nuevo la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen).

Tras la ligación, se procede a realizar la transformación del mismo modo que se realizó durante el proceso de clonación, pero añadiendo un volumen de 5-10 µl del producto de ligación. Al día siguiente, se seleccionan las colonias y se cultivan en 8 ml de LB con el antibiótico correspondiente en función del vector utilizado, y se dejan crecer

durante toda la noche a 37°C. Transcurrido este tiempo, se purifica el plásmido mediante el kit “Miniprep”, se vuelve a correr un gel de agarosa para determinar cuales tienen el inserto y finalmente, se secuencian las construcciones para confirmar que se ha incorporado el inserto sin ningún error y poder comenzar con los experimentos requeridos.

1.4. Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida es una técnica que nos ha permitido introducir mutaciones en la posición de interés en una secuencia conocida de ADN. Todos los mutantes empleados en esta Tesis doctoral se han obtenido mediante esta técnica, sobre la construcción portadora del ADNc que se quiere mutar siguiendo el protocolo del kit “Quick Change Site directed mutagenesis” (GE Healthcare).

El primer paso es el diseño de los oligonucleótidos con la mutación de interés incorporada. Los oligonucleótidos, deben tener una longitud de entre 25 y 45 bases, un número de G/C superior al 40% y con una temperatura de fusión (T_m) superior a 78°C. La siguiente fórmula fue empleada para estimar la T_m de los oligonucleótidos:

$$T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 675/N \text{ (donde } N = \text{longitud de oligonucleótido)}$$

Las condiciones de PCR (*polymerase chain reaction*) empleadas son: 2,5 µl de Buffer de reacción 10x, 0,5 µl dNTPs, 125 ng de cada oligonucleótido, 1,5 µl de QuickSolution, 10 ng/µl del plásmido de interés y a la mezcla final se le añade 0,5 µl de la Pfu Turbo ADN polimerasa (GE Healthcare). Las condiciones de amplificación son: 95°C de desnaturalización inicial durante 1-2 minutos, 16-18 ciclos de 95°C durante 50 segundos, 58-60°C durante 50 segundos-1 minuto y 68°C durante 10-18 minutos, con una extensión final de 7 minutos a 68°C.

Una vez finalizada la reacción de PCR, se añade 10U de la enzima de restricción DpnI, para eliminar el plásmido utilizado como molde y que no contiene la mutación de interés. Seguidamente, se lleva a cabo la transformación en células ultracompetentes, XL 10-Gold, añadiendo 2 µl de β-ME, que incorporado en el ensayo, facilita la transformación.

Al día siguiente, se seleccionan un número determinado de colonias y se ponen a crecer en 8 ml de medio LB con un determinado tipo de antibiótico que varía en función del vector empleado. Finalmente, se purifican los plásmidos utilizando el kit “Miniprep” y se secuencian para confirmar que se ha introducido la mutación de interés en la secuencia elegida y que no se han introducido otros cambios. Una vez confirmado,

se hace "Midiprep" (Genomed) para obtener mayor cantidad de ADN y poder emplearlo en futuros experimentos.

2. ANTICUERPOS

Los anticuerpos primarios empleados en la presente Tesis doctoral están indicados en la tabla 3. Los anticuerpos secundarios empleados fueron: anti-inmunoglobulina de ratón generado en conejo, anti-inmunoglobulina de conejo generado en cabra (Vector labs) y anti-inmunoglobulina de ratón (Vector Labs) conjugado con Alexa Fluor 488 (Commercial Molecular Probes, Invitrogen).

Tabla 3: Listado de anticuerpos empleados.

| Anticuerpo | Péptido | Monoclonal/ Policlonal | Especie | Código de Anticuerpo |
|----------------------|---|---------------------------|---------|---------------------------|
| SHOX | KVHVDNDKEKLKEF | Policlonal | Conejo | Producción propia |
| SHOX2 | PGSPRLTEVSPELKDRKEDA KGMEDEGQTKIKQRRSRTN FTLEQLNELER | Policlonal | Conejo | SAB2102137 (Sigma) |
| SOX5 | Situado entre los aa 286-335 de la proteína SOX5 humana | Policlonal | Conejo | Ab26041 (Abcam) |
| SOX6 H-95 | Situado entre los aa 506-600 de la proteína SOX6 humana | Policlonal | Conejo | Sc-20092 (Santa Cruz) |
| SOX9 | Situado entre los aa 1-100 de la proteína SOX9 humana | Policlonal | Conejo | Ab26414 (Abcam) |
| MAGED1 | EAEARAEARNRMGIGDE de la proteína de rata | Policlonal | Conejo | Dr. Phillip Barker (EEUU) |
| PKM2 | Péptido seleccionado de la región C-terminal de la proteína humana PKM2 | Policlonal | Conejo | Ab38237 (Abcam) |
| 1-TBP18 | Situado entre los aa 1-20 de la proteína TBP de humano, rata y ratón | Monoclonal | Ratón | Ab818 (Abcam) |
| HA | YPYDVPDYA | Monoclonal | Ratón | H-9658 (Sigma) |
| FLAG | DYKDDDDK | Monoclonal | Ratón | F-3165 (Sigma) |

3. INMUNOHISTOQUÍMICA

Las muestras empleadas para el experimento fueron secciones de tibia y costilla de abortos espontáneos de fetos humanos de diferentes semanas de gestación. Uno de ellos de 27 semanas, presenta DML, el resto de los fetos están comprendidos entre 18 y

38 semanas de gestación y son fetos que no están asociados a ninguna displasia. El estudio ha sido aprobado por el comité ético local.

La inmunohistoquímica comienza cuando las secciones en parafina de la placa de crecimiento son desparafinadas y rehidratadas hasta agua mediante el PTlink (Dako), durante 20 minutos a 95°C en la solución Target Retrieval Solution, pH 9,0 (Dako). Se incuban primero con 0,3% H₂O₂ en metanol y después 10% de suero fetal bovino (SFB) en PBS preparado con el kit Vectostain (Vector Laboratories, Inc). Las muestras fueron incubadas a 4°C todo la noche con el anticuerpo primario, a una dilución desde 1:50 hasta 1:100. El sistema biotina/avidina-HRP (ABC Universal kit, Vector Labs) fue empleado para la unión al anticuerpo y la visualización de los resultados mediante el revelado con DAB (Vector Labs). Finalmente las secciones fueron teñidas con hematoxilina durante 30 segundos, deshidratadas con inmersión en diferentes alcoholes y montadas con Depex (BDH).

La visualización y fotografía de las muestras se realiza mediante el software Cell[^]a (Olympus) en un microscopio óptico Olympus BX41 y una cámara Olympus DP20.

4. DOBLE HÍBRIDO DE LEVADURAS

4.1. Ensayo del doble híbrido de levaduras

El doble híbrido de levaduras es una técnica que nos permite identificar la interacción de dos proteínas *in vivo* basándose en el uso de factores de transcripción. Estos factores de transcripción suelen tener dos dominios, el dominio de activación de la transcripción (AD: *activation domain*) y el dominio de unión al ADN (BD: *DNA-binding domain*), de éstos dos, el verdaderamente específico es el BD, ya que es capaz de unirse a genes promotores de los mensajeros (Fig.15).

Una de nuestras proteínas, clonadas en el vector pGBT9 (Clontech), se fusiona con el dominio de unión al ADN del factor de transcripción GAL4 (GAL4 DNA-BD), que contiene el gen encargado de sintetizar triptófano (TRP1), la otra proteína, clonada en el vector pACT2 (Clontech), se une al dominio de transactivación de GAL4 (GAL4AD), y que contiene el gen encargado de sintetizar leucina (LEU2). Ambos vectores, se transforman en una cepa de levaduras Y187 que no es capaz de sintetizar ni leucina ni triptófano y que contiene dos copias del gen reportero *LacZ*, cuyo producto es la enzima beta- galactosidasa. Por lo tanto, aquellas células de la cepa Y187 que sean capaces de crecer en un medio sin leucina y sin triptófano habrán sido transformadas en los vectores pGBT9 y pACT2.

Para cuantificar la interacción, se lleva a cabo un ensayo líquido de la beta-galactosidasa usando el rojo CRPG (rojo cloro fenol beta D-galactopiranosido, Sigma) como sustrato. El CRPG es degradado por la beta-galactosidasa en D-galactosa y rojo clorofenol. La fuerza de interacción de la reacción se calcula midiendo la densidad óptica a 578nm (DO_{578}) de la muestra, reflejo de la cantidad del producto rojo clorofenol generado por la enzima beta-galactosidasa (Fig.15).

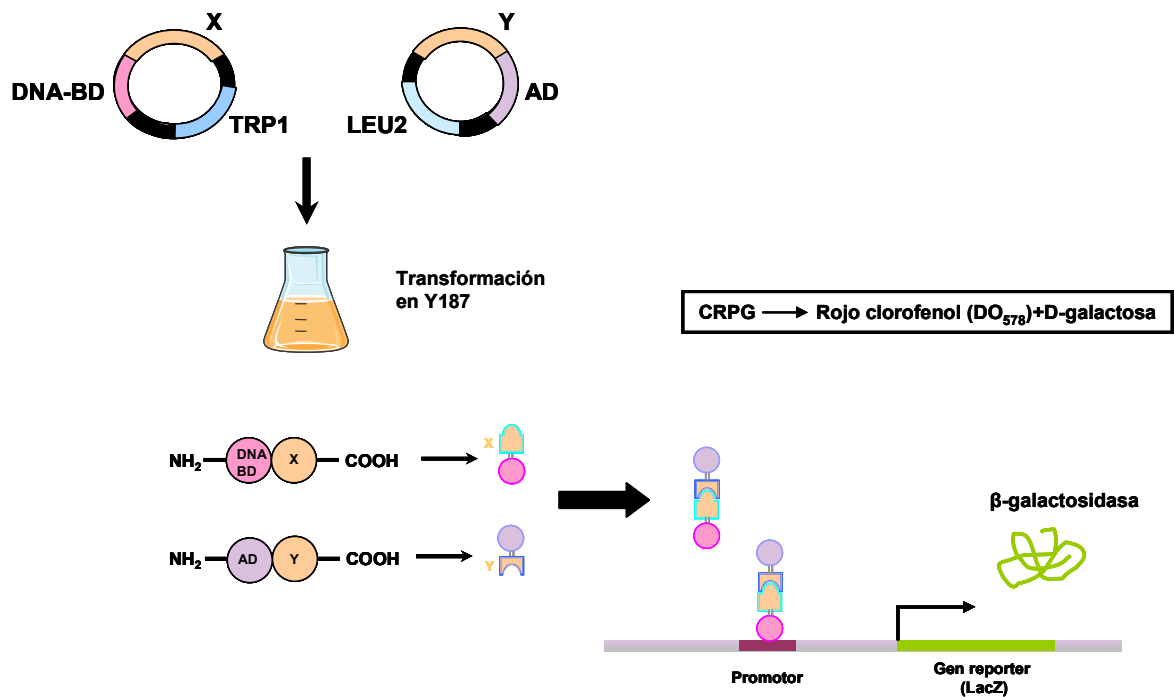


Figura 15. Esquema del ensayo de doble híbrido de levaduras. La figura muestra la interacción de las dos proteínas de interés en la cepa de levaduras Y187 que activa la expresión del gen reportero LacZ, y codifica la enzima beta-galactosidasa. La beta-galactosidasa convierte el CRPG en D-galactosa y rojo clorofenol. DNA-BD = dominio de unión al ADN de GAL4, AD = dominio de transactivación de GAL4, X e Y = proteínas de interés, DO_{578} = Densidad óptica a 578nm.

4.2. Transformación de levaduras

El primer día se prepara un preinoculo a partir de una única colonia de la cepa de levaduras Y187 en 10 ml de YPDA (8,6 ml de YDP 1X (extracto de levadura 1%, DIFCO, triptona 2% - DIFCO), glucosa 2% (Panreac) y 0,4 ml de adenina hemisulfato 0,2% (Sigma) incubándolo durante toda la noche a 30 °C, 240 rpm en un agitador orbital.

El segundo día se prepara un nuevo cultivo con 6 ml del preinoculo en 50 ml de YPDA y se incuba a 30°C y 240 rpm. El cultivo se deja creciendo hasta que alcance una densidad óptica de 0,8-0,9 medida a 600nm (DO_{600}). Una vez alcanzada la densidad óptica idónea, las células se resuspenden en 1 ml de TE (Tris 1M pH 7,4, EDTA 0,5M, pH 8,0) + AcLi (Acetato de litio, Sigma) lo que hace que las células sean competentes y

alteren su membrana celular para que se transformen. Se preparan alícuotas de 250 μ l a las que se le añade 250 μ l de PEG 3350 50% (Polietilenglicol, Sigma), 36 μ l de Acetato de Litio 1M (Sigma), 50 μ l de ssDNA 2 mg/ml (ácido desoxirribonucleico monocatenario, Sigma) previamente desnaturalizado durante 5 minutos a 100°C y finalmente 500 ng del plásmido purificado. Posteriormente, se mezcla la suspensión y se incuba a 30°C y 240 rpm durante 30 minutos, tras añadirle 30 μ l de DMSO 10% (dimetil sulfóxido, Sigma) se lleva a cabo el choque térmico introduciendo las muestras en un baño a 42°C durante 30 minutos. Se centrifugan las muestras a 14000 rpm durante un minuto, se resuspende el pellet suavemente en 1 ml de YPDA y se traspasa a un tubo aireado. Inmediatamente después, se dejan crecer las células durante 1 hora a 30°C y 240 rpm, se centrifugan y se resuspenden en 100 μ l de tampón TE, pH 7,4.

Finalmente, se siembran 50 μ l de células en placas que no contienen ni leucina ni triptófano (SD/-Leu/-Trp, Clontech) y se dejan incubando a 30°C en un tiempo estimado de entre 2 y 5 días. Transcurrido este tiempo, en las placas aparecerán colonias de aquellas células que hayan sido capaces de ser transformadas con los dos plásmidos de interés: pGBT9 y pACT2.

4.3. Ensayo líquido de Beta-galactosidasa

Mediante este ensayo, podremos calcular la intensidad de interacción entre las proteínas de estudio usando el CRPG como sustrato de la reacción cuyo protocolo está descrito en el “*Matchmaker Yeast Protocols Handbook*” (Clontech). Para cada transformación, se llevan 4-5 ensayos independientes y a su vez, cada uno de ellos por triplicado.

El primer día se preparan 4-5 preinóculos por cada combinación en 5 ml de medio SD (base nitrogenada de levadura sin aminoácidos 70% - DIFCO, glucosa 20%) suplementado con una combinación de aminoácidos sin leucina y sin triptófano (CLONTECH) y se deja crecer a 30°C y 240 rpm durante toda la noche en un agitador orbital. Al día siguiente, se centrifugan las células a 1200 rpm durante 8 minutos y el pellet es resuspendido en 9 ml de YPDA. Estos cultivos se vuelven a incubar entre 3-7 horas en las mismas condiciones que la noche anterior, hasta que alcance una DO_{600} de entre 0,5-0,8. A continuación, se preparan 3 alícuotas de 1,5 ml de cultivo y se centrifugan. El precipitado de células se resuspende en 300 μ l de Buffer de lisis (HEPES 100mM, NaCl 150mM, L-Aspartato 0,065%, BSA 1%, Tween20 0,05%, pH 7,3; Sigma). El tercer día, se transfieren 100 μ l de cada alícuota a un nuevo tubo y se lisan las células mediante 3 ciclos de inmersión en nitrógeno líquido e introduciéndolas en un baño a 37°C después de cada inmersión.

Después de la lisis, se lleva a cabo el ensayo enzimático añadiendo 350 µl de CRPG resuspendido en buffer de lisis. A partir de este momento comienza el ensayo enzimático, donde las muestras cambian de color (pasando de un color amarillo a un color rojo-anaranjado), debido a la beta-galactosidasa que hay en el medio. En el momento en el que el color es más intenso, se anota el tiempo, y se añaden 250 µl de ZnCl_2 3mM (Sigma) para parar la reacción enzimática. Posteriormente, se mide la DO_{578} de la solución, que deberá estar entre los valores 0,25-1,8. Por último, se calculan las unidades de beta-galactosidasa a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades de beta-galactosidasa} = 1000 \times \text{DO}_{578} / t \times V \times \text{DO}_{600}$$

Unidades de beta-galactosidasa = cantidad de 1 µmol CRPG hidrolizado en 1 min/célula

T = tiempo de incubación con sustrato (minutos)

V = volumen = 0,1 x factor de concentración (5)

DO_{600} = densidad óptica de 1 ml de cultivo

5. ESTUDIOS CELULARES

5.1. Líneas celulares y medio de crecimiento

- Células U20S - Células de osteosarcoma humano (ATCC: HTB-96).
- Células HEK293 - Células de riñón de embrión humano transformadas con adenovirus tipo 5 (ATCC: CRL-1573).
- Células HeLa - Células derivadas de cáncer cérvico-uterino obtenidas de Henrietta Lacks (ATCC: CCL-2).

El medio de crecimiento de estas células es DMEM (GIBCO BRL) + 10% SFB inactivo (GIBCO BRL) + 1X antibióticos (penicilina y estreptomycin, GIBCO BRL).

5.2. Transfección

Se siembran 3 millones de células por placa de 10 cm de diámetro o 160000 células por pocillo en placas de 12 pocillos. Tras 24 horas de crecimiento, se transfectan con FuGENE 6 (Promega) siguiendo las pautas de la casa comercial.

5.3. Lisis celular

Aproximadamente 24 horas después de la transfección, se lleva a cabo la lisis celular empleando los reactivos del kit "Nuclear Complex CO-IP" (Active motif). El primer paso es recoger las células con PBS (*Phosphate buffered saline*) e inhibidores

de fosfatasa, se centrifugan durante 5 minutos a 4°C y se resuspenden en 500 µl de buffer hipotónico, provocando que las células se rompan por ósmosis. Las muestras se incuban en hielo durante 15 minutos y pasado este tiempo se añaden 25 µl de detergente, después de centrifugarlas a 14000g a 4°C para un minuto. El precipitado contiene la fracción nuclear mientras el sobrenadante conforma la fracción citoplásmica. Para continuar con la digestión y extracción de la fracción nuclear se resuspende el pellet en 150 µl de buffer de digestión completa y 0,75 µl de mezcla de enzimas de restricción, que ayuda a degradar suavemente el ADN. Posteriormente se incubaba durante 90 minutos a 4°C y se añade 3 µl de EDTA 0,5M para parar la reacción. Finalmente, se centrifuga a 14000g durante 10 minutos a 4°C para recoger el sobrenadante (fracción nuclear) y se realiza un ensayo de Bradford (Bio-Rad) para cuantificar la cantidad de proteína.

6. INMUNOPRECIPITACIÓN

Mediante esta técnica pudimos confirmar las interacciones proteicas en células humanas HEK293. Se realizó usando los reactivos del kit “Nuclear Complex Co-IP” (Active Motif). El primer paso consiste en obtener lisados nucleares que contengan y/o sobre-expresen las dos proteínas de interés que se desean inmunoprecipitar (ver sección 5.3). Una de ellas deberá estar unida al epítipo FLAG, ya que el anticuerpo que se utiliza para inmunoprecipitar es anti-FLAG unido a agarosa (SIGMA). La otra proteína puede o no estar unida al epítipo HA dependiendo de la interacción que queramos observar. Los lisados nucleares deben ser frescos, sin haber sido congelados previamente.

La inmunoprecipitación comienza cuando se añaden a 500 µg del lisado tampón de incubación (HEPES 20mM, NaCl 75mM y NP-40 0,1%, pH 7,9 Active Motif) hasta alcanzar un volumen final de 500 µl. A estas muestras se les añade 20 µl de resina precipitada (anti-FLAG agarosa), previamente lavada con PBS (1 volumen de resina: 20 volúmenes de PBS) y mezclada con el mismo tampón de incubación. Ésta mezcla se incubaba rotando en la noria a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente, las muestras se centrifugan a 4000 rpm durante 30 segundos y a 4°C. A partir de aquí, comienzan los lavados: se realizan 3 lavados con 500 µl de tampón de incubación más BSA 1mg/ml (Active Motif) y otros 3 lavados con 500 µl de tampón de incubación solo. Después de cada lavado las muestras son centrifugadas durante 30 segundos a 4°C y a 4000 rpm, se elimina el sobrenadante y tras cada centrifugación se conserva la resina. Tras la última centrifugación, se resuspende el pellet en 30 µl de tampón de carga de electroforésis para proteínas 2X (Tris HCl 0,12M

pH 6,8, SDS 1,6%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,02%; Sigma) y se incuban las muestras a 100°C durante 3 minutos, después de dejarlo enfriar a temperatura ambiente, las muestras se centrifugan durante 1 minuto a 4000 rpm. Finalmente, se realiza un western-blot con las muestras inmunoprecipitadas y con los lisados celulares, empleando en cada caso el anticuerpo adecuado para cada una de las proteínas que queremos analizar.

7. INMUNOCITOQUÍMICA

Se siembran 65.000 células U2OS en un portaobjetos con cuatro pocillos (BD Clontech) al día siguiente se transfectan con los vectores de interés y los dos vectores vacíos como controles. Después de 24 horas de transfección, se lavan las células con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y con agitación y se fijan con paraformaldehído 4% (Sigma) disuelto en tampón fosfato 0,1M pH 7,2, durante 20 minutos en las mismas condiciones mencionadas anteriormente pero en esta ocasión en oscuridad. Tras lavar cada pocillo con PBS, se bloquean las células durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación con tampón de bloqueo con glicina 0,3M (0,5% de BSA, 1,1% de glicina en 50 ml de PBS-Tween (0,2% Tween 20 en PBS)). Las preparaciones se incuban con el anticuerpo primario diluido en 1% BSA-PBS-Tween20 durante 1 hora con las condiciones anteriormente nombradas, después de lavar cada pocillo 3 veces con PBS-Tween20 se incuban las células con un anticuerpo secundario fluorescente. El anticuerpo secundario empleado fue anti-inmunoglobulina de ratón (Vector Labs) conjugado con Alexa Fluor 488 (Commercial Molecular Probes, Invitrogen). Las células fueron lavadas con PBS-T, los núcleos se tiñeron con DAPI (Sigma) y finalmente las preparaciones se montaron con Mowiol 40-88 (Sigma). Las muestras fueron analizadas mediante un microscopio confocal TCS SP5 (Leica).

8. ENSAYO DE LUCIFERASA

Esta técnica nos permite cuantificar la actividad transcripcional de una región reguladora mediante la expresión de luciferasa de un gen reportero bioluminiscente.

Se siembran 160.000 células U2OS en una placa de 12 pocillos, y 24 horas después de la transfección comienza la lisis celular pasiva siguiendo el protocolo de "*Dual-luciferase reporter assay system*" (Promega). A cada pocillo se le añade tampón de lisis pasiva (PLB 5X) y tras 15 minutos en una placa en movimiento a temperatura ambiente se recogen los lisados celulares. Tras la lisis se procede a la lectura de la luminiscencia de las dos luciferasas ("*firefly*" y "*renilla*") mediante el protocolo de "*Dual-*

luciferase reporter assay system" (Promega) y el lector Infinite M200 NanoQuant (TECAN). Estas dos luciferasas, empleando diferentes sustratos, emiten luz a diferentes longitudes de onda, por ello son empleadas en este tipo de ensayos. Cada combinación de plásmidos se ha transfectado por duplicado, y se ha medido la actividad de luciferasa por triplicado. Las muestras se han normalizado, en primer lugar respecto a la actividad de la luciferasa "renilla" y posteriormente, respecto a la actividad de la transfección que contiene sólo, el plásmido reportero vacío.

9. ESTUDIOS GENÉTICOS

Todos los pacientes y miembros de las familias estudiadas en la presente Tesis doctoral tienen su consentimiento informado. El estudio ha sido aprobado por el comité ético local de varias instituciones implicadas. Los pacientes estudiados estaban diagnosticados con DLW ó DML sin defecto molecular conocido. La cohorte de pacientes varía en función del gen estudiado: *SHOX2*: (n=82); *SOX5* (n=56) y *SOX6* (n=79).

10. ANÁLISIS MUTACIONAL

El ADN genómico de los pacientes se extrajo de sangre periférica empleando el Kit "Blood kit" (Qiagen).

Los exones fueron analizados mediante el "High resolution melting" (HRM, Análisis de fusión de alta resolución). El HRM es una técnica que nos permite detectar la presencia de mutaciones, para ello se precisan los mismos componentes que para una reacción de PCR normal pero añadiendo el intercalante LCGreen Plus (Idaho Technologies), posteriormente se produce una fusión de los productos de PCR optimizados y un análisis de las curvas de fusión. Las condiciones de PCR y la formación de heterodúplex son: 95°C durante 5 minutos para la activación de la enzima y 40 ciclos de 94°C de desnaturalización durante 30 segundos, 66°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos para el tiempo de extensión, 9°C durante 30 segundos y 25°C durante 30 segundos. El análisis se realizó en el LightScanner HR96 system (Idaho Technologies, SLC, Utah). Finalmente, se secuenciaron aquellas muestras que presentaban una curva de fusión diferente a los controles. Antes de proceder a la secuenciación, se debe realizar una purificación de las muestras para eliminar cebadores no incorporados y dNTP. Para esta purificación, se emplea la solución EXO-SAP-IT (GE Healthcare) que contiene dos enzimas hidrolíticas: Exonucleasa I y Fosfatasa alcalina siguiendo el protocolo de la casa comercial.

Posteriormente, se secuencian usando el kit de secuenciación “BigDye 3.1” (Applied Biosystems), tal y como indica la casa comercial, mediante el secuenciador ABI3730XL y las muestras se analizaron con el programa Sequencher 5.0.

11. ANÁLISIS DEL HAPLOTIPO

El estudio del haplotipo fue realizado mediante el uso de marcadores microsatélites localizados intragénicamente o flanqueando al gen *SHOX*. Los oligonucleótidos y las condiciones de los microsatélites están detallados en la tabla 4. Las condiciones de PCR empleadas fueron: 95°C de desnaturalización durante 15 minutos, 34 ciclos de 95°C durante 40 segundos, 57°C durante 40 segundos y 72°C durante 45 segundos, con una extensión final de 8 minutos a 72°C. Los microsatélites se analizaron mediante el secuenciado ABI3130XL (Applied Biosystems).

Tabla 4. Detalles de los marcadores microsatélites empleados en el análisis del haplotipo.

| Nombre microsatélite | Unidad repetida | Secuencia del oligo sentido y antisentido (5'>3') | Temp. anillamiento | Rango del amplicón |
|----------------------|---------------------|---|--------------------|--------------------|
| | | | (°C) | (bp) |
| DXYS10037 | (CA) _n | CCCAGGCCCTGTTTACGCTTCG TATCCTCACAACCTGCGTCTCC | 58-59 | 180-220 |
| DXYS10036 | (TGAT) _n | GTACATAGATGGCAGATAGATG CTGCATGTATACACACTGTAAT | 48.8 | 197-221 |
| DYS201 | (CA) _n | GACACAGAAATCCTTCATAAAATAAT CATGTCATATATATATGTGATTC | 49 | 133-155 |
| DXYS10092 | (GA) _n | TTCGTGACAAAGGCCTTT GCCTACAAGTCCTAGTACCTAC | 51-53 | 317-367 |
| DYS290 | (CTTT) _n | GGGCTGTGACCAGTTCTCA TCTTGAAGCCAGGAGGTAGA | 54-55 | 292-308 |
| DXYS10093 | (CT) _n | GCCCGTGATCCCACTACTG CAACTTCCTTGAAATCTTC | 53-55 | 233-259 |
| DXYS10083 | (TG) _n | GGGGGTGTTTGAAATGGTATAAT TTACAATGTATGTCAGCAGAGACC | 50.8 | 150-172 |
| DXYS10085 | (TG) _n | AGCCTGTAGTGCCTCAACTTC GAGTGGCAGCACGTTAATGTCA | 54 | 206-228 |

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se determinó la frecuencia alélica en un total de 88 individuos sanos de origen gitano, para cada uno de los marcadores microsatélites mencionados anteriormente. Para determinar la probabilidad de que un haplotipo aparezca en la población gitana, se

estudió los genotipos de los marcadores microsatélites, en dos poblaciones controles: una cohorte de gitanos españoles no afectados (88 individuos= 176 cromosomas) y una cohorte de individuos españoles con estatura normal (173 individuos= 346 cromosomas). Se llevó a cabo un recuento de las variantes alélicas para cada uno de los marcadores microsatélites determinando la frecuencia de aparición de cada uno de ellos. Posteriormente obtuvimos la frecuencia esperada mediante análisis de probabilidad (Probabilidad del haplotipo= probabilidad variante alélica del genotipo1 x probabilidad variante alélica del genotipo 2....x probabilidad variante alélica del genotipo n).

13. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

La identificación de secuencias de nucleótidos de ADNc se realizó usando el programa BLAST (Basic Local alignment Search Tool) localizado en la dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Las secuencias de exones e intrones de los genes analizados en la presente Tesis Doctoral se obtuvieron en <http://www.ensembl.org/>. Las referencias de las patologías asociadas a los diferentes genes mencionados en la presente tesis doctoral se obtuvieron en la dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>.

RESULTADOS

Capítulo 1. Identificación de las dianas transcripcionales y caracterización de las interacciones proteicas de SHOX2

Capítulo 2. Identificación y caracterización de dos mutaciones del gen *SHOX*

CAPITULO 1. IDENTIFICACIÓN DE LAS DIANAS TRANSCRIPCIONALES Y CARACTERIZACIÓN DE LAS INTERACCIONES PROTEICAS DE SHOX2

1. DIMERIZACIÓN DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE SHOX2

Los factores de transcripción que pertenecen a la familia *paired related*, como SHOX2, están formados por un homeodominio que les permite homo- y heterodimerizar (Wilson et al., 1993, 1995). Debido a que SHOX2 presenta dos isoformas, SHOX2a y SHOX2b, y que ambas poseen este dominio en su estructura (Fig.16) se pensó que estas proteínas podrían dimerizar entre sí.

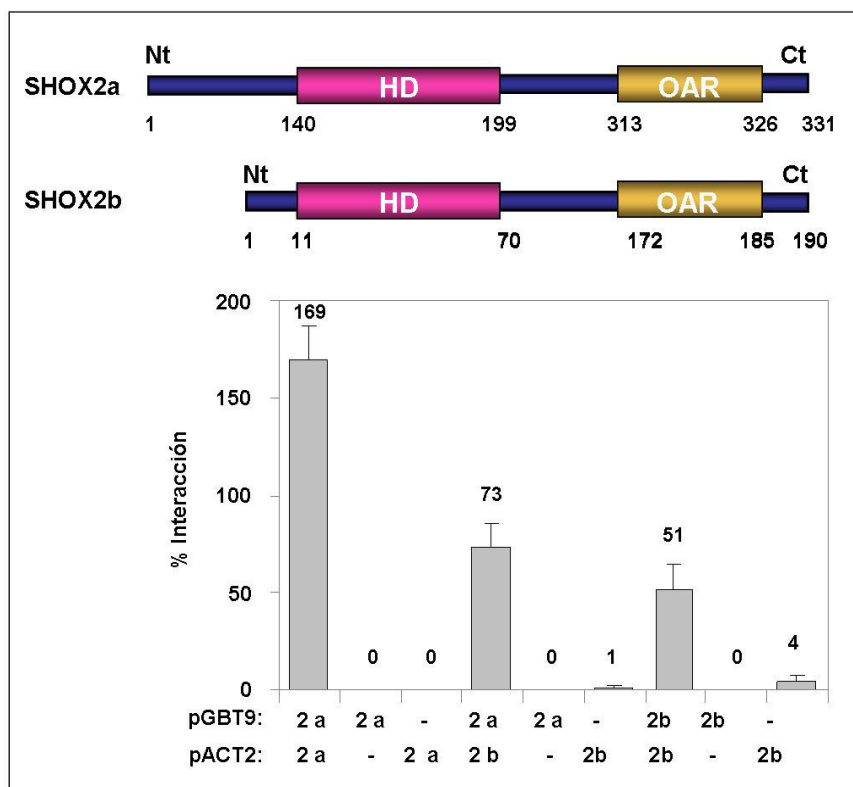


Figura 16. Dimerización de las distintas isoformas de SHOX2: SHOX2a y SHOX2b. Se cotransformaron células de la cepa de levaduras Y187 con vectores que expresan el dominio de unión al ADN de GAL4 (pGBT9) o el dominio de transactivación de GAL4 (pACT2) unidos a las distintas isoformas de SHOX2: SHOX2a y SHOX2b. Como controles negativos se hicieron interaccionar las proteínas salvajes con los vectores vacíos. Se compara la capacidad de dimerización de las distintas isoformas con respecto a la homodimerización de SHOX2a, fijándose el valor relativo de ésta como 100%. Mediante este método hemos identificado las diferentes homo- y hetero-dimerizaciones entre las dos isoformas de SHOX2.

Para determinar la existencia de esta homodimerización realizamos un ensayo de doble híbrido de levaduras midiendo la actividad de la enzima β -galactosidasa y usando CRPG como sustrato de la reacción. Mediante este método hemos identificado las homo- y heterodimerizaciones entre las diferentes isoformas, SHOX2a-SHOX2a, SHOX2a-SHOX2b, SHOX2b-SHOX2b, observándose la interacción más fuerte entre las isoformas SHOX2a-SHOX2a. Los estudios han sido realizados con la isoforma SHOX2a, a partir de ahora nos referiremos a ella como SHOX2 (Fig.16).

1.1. Localización del dominio de SHOX2 implicado en la dimerización

Con el propósito de identificar qué dominio de SHOX2 está implicado en la dimerización, se construyeron clones parciales que contenían las diferentes regiones de SHOX2. Posteriormente, se evaluó la capacidad de interacción mediante el ensayo del doble híbrido de levaduras (Fig.17).

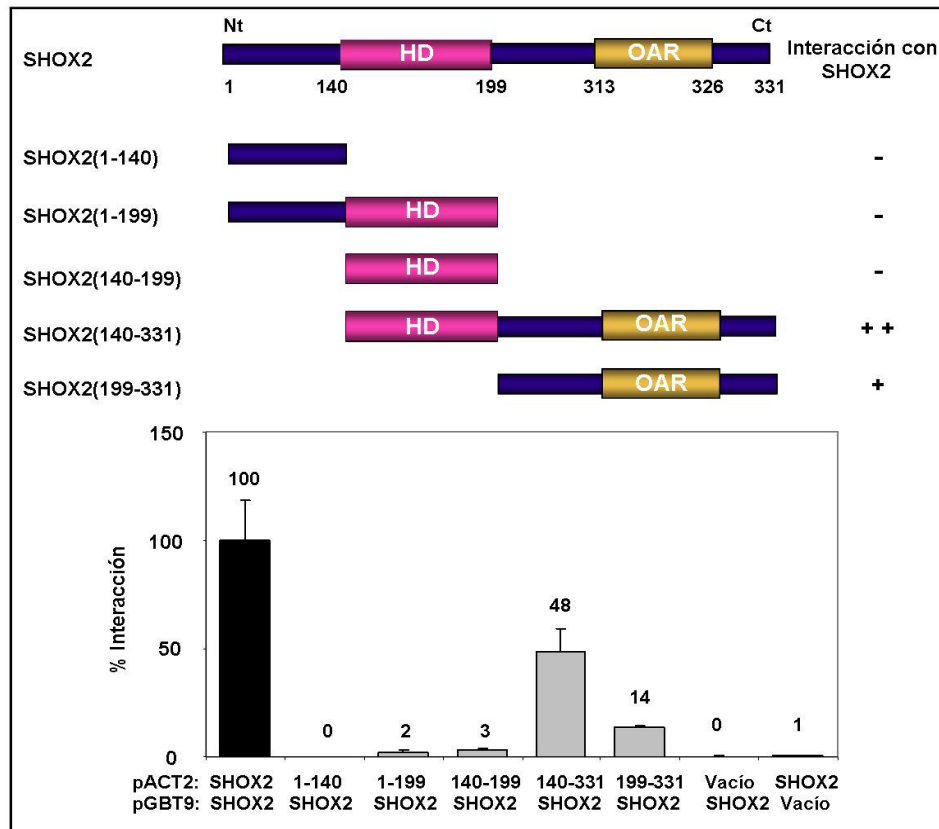


Figura 17. Identificación del dominio de SHOX2 implicado en la dimerización. En la imagen superior se observa la proteína SHOX2 completa, indicándose los aminoácidos que limitan cada región. El dominio HD, se corresponde con el homeodominio de la proteína, y el OAR, con el dominio de transactivación. La intensidad relativa de la interacción está indicada con símbolos (+). Se cotransformaron en células de la cepa de levaduras Y187 los vectores de expresión pACT2 y pGBT9, el primero de ellos, contiene el dominio de transactivación de GAL4 (GAL4AD) unido a los diferentes dominios de SHOX2, y pGBT9 contiene el dominio de unión al ADN del factor de transcripción GAL4 unido a la proteína SHOX2 salvaje. Como control positivo, se midió la intensidad de la interacción de las proteínas salvajes (columna negra), el resto de las interacciones se analizaron a partir de ese valor de referencia. Como controles negativos se hicieron interaccionar las proteínas salvajes con los vectores vacíos. Sobre cada columna aparece el valor de interacción. El ensayo demuestra que la interacción entre las dos isoformas de SHOX2 se produce a través del HD y el OAR.

El análisis de la capacidad de interacción de los diferentes dominios de SHOX2 con la proteína SHOX2 salvaje, demostró que el único clon que interacciona de forma clara es el SHOX2 (140-331), que contiene el homeodominio y el dominio de transactivación. La leve interacción observada con el clon SHOX2 (199-331), que contiene la región C-terminal y el OAR, sugiere que la dimerización entre SHOX2 se produce a través del homeodominio y la región C-terminal que contiene el OAR (Fig.17). Los clones SHOX2 (1-199) y SHOX2 (140-199) no interaccionan con SHOX2 a pesar de tener el HD, probablemente por la inestabilidad de la proteína y la necesidad del OAR para dicha interacción.

1.2. Localización del dominio de SHOX2 implicado en la interacción con SHOX2 mediante la capacidad de dimerización de los mutantes de SHOX2 con la proteína SHOX2

Para poder confirmar los dominios de SHOX2 implicados en la homodimerización, se determinó la capacidad de interacción de siete mutaciones puntuales localizadas a lo largo de las diferentes regiones de SHOX2, con la proteína SHOX2 salvaje. Se seleccionaron los aminoácidos homólogos de SHOX2 que correspondían con los aminoácidos de las mutaciones empleadas en experimentos de interacción con SHOX. Se emplearon mutaciones de SHOX que habían sido descritas en pacientes con DLW ó TBI (SHOX mutation database, <http://www.hd-lovd.uni-hd.de/>) y se diseñaron nuevas mutaciones para cubrir todas las regiones de SHOX2. Para ello se seleccionaron aminoácidos altamente conservados y se substituyeron por otros química y estructuralmente distintos, y mediante mutagénesis dirigida, se obtuvieron las mutaciones correspondientes en SHOX2.

Para realizar el ensayo, dichas mutaciones se clonaron en el vector pGBT9 evaluándose su fuerza de interacción con la proteína SHOX2 salvaje. En los resultados observamos que las mutaciones SHOX2 p.L155V y p.A193P, ambas localizadas en el homeodominio, reducen la capacidad de interacción a valores <50%, en cambio, la mutación p.R196C, localizada también en el homeodominio, no altera la capacidad de interacción. Esta mutación se encuentra en la hélice II del HD lo que sugiere que esta región no estaría implicada en la interacción. Además, la mutación p.R319P, localizada en el OAR, también reduce la capacidad de interacción. Las mutaciones, p.R218Q y p.A269D, localizadas fuera de los dos dominios mencionados, tampoco reducen la capacidad de interacción. Por ello, confirmamos que la dimerización de SHOX2-SHOX2 se produce a través del homeodominio y del dominio de transactivación (Fig.18).

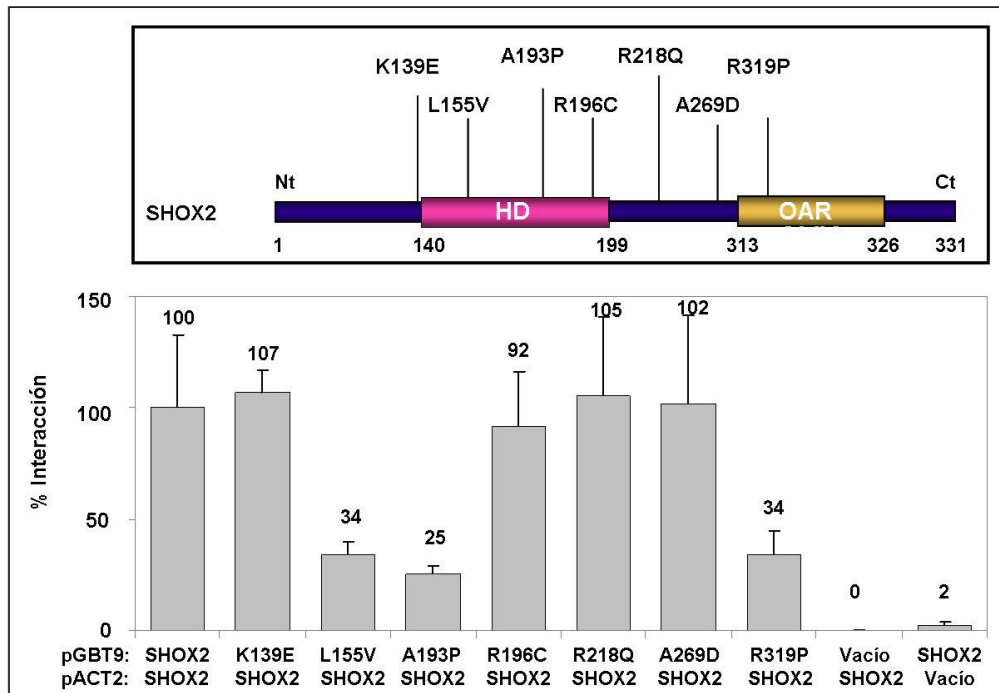


Figura 18. Análisis de la capacidad de dimerización de las siete mutaciones puntuales localizadas a lo largo de los diferentes dominios de SHOX2. En la figura superior se observa el esquema de la proteína SHOX2 indicando la localización de las mutaciones puntuales examinadas en el estudio. Las mutaciones analizadas fueron generadas por mutagénesis dirigida y están distribuidas en los diferentes dominios de SHOX2. Para confirmar el dominio de interacción implicado (Fig. inf.) se cotransformaron en células de la cepa de levaduras Y187 los vectores de expresión pACT2 y pGBT9, el primero de ellos, contiene el dominio de transactivación de GAL4 (GAL4AD) unido a la proteína SHOX2 salvaje, y pGBT9 contiene el dominio de unión al ADN del factor de transcripción GAL4 unido a las proteínas mutantes de SHOX2. Como control positivo, se midió la intensidad de la interacción de las proteínas salvajes (columna negra), el resto de las interacciones se analizaron con respecto a ese valor de referencia (100%). El análisis de las mutaciones puntuales localizadas a lo largo de las regiones de SHOX2, confirma que la interacción entre SHOX2-SHOX2 se produce a través del HD y el OAR.

2. INTERACCIÓN DE SHOX2-SHOX

2.1. Localización del dominio de SHOX2 implicado en la interacción con SHOX

La caracterización de los dominios de SHOX2 implicados en la interacción con SHOX se realizó mediante la evaluación de la fuerza de interacción de los clones que contienen cada uno de los dominios de SHOX2 con la proteína SHOX salvaje mediante el ensayo del doble híbrido de levaduras (Fig.19).

Se demuestra que sólo la construcción SHOX2 (140-331), que contiene el HD y el OAR, es capaz de interactuar de forma clara con SHOX (Fig.19), de hecho, los clones que contienen solamente el HD, SHOX2 (140-199) ó el OAR, SHOX2 (199-331) no interactúan con SHOX, sugiriendo que los dos dominios, el HD y la región C-terminal que contiene el OAR, están implicados en la interacción con SHOX (Fig.19).

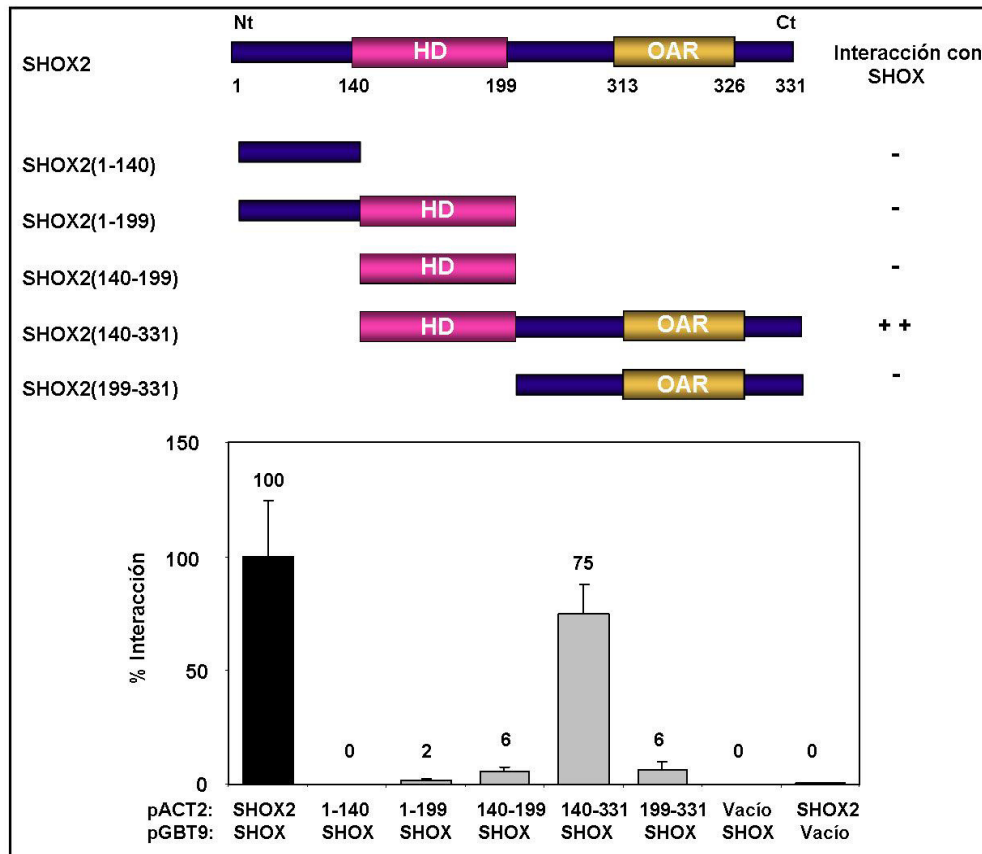


Figura 19. Identificación del dominio de SHOX2 implicado en la interacción con SHOX. En la imagen superior se observa el esquema de la proteína SHOX2 completa con las coordenadas de cada uno de los dominios indicadas. El dominio HD, corresponde con el homeodominio de la proteína, y el OAR, al dominio de transactivación. La intensidad de la interacción entre ambas proteínas aparece marcada con el símbolo (+). Para determinar la interacción, se cotransformaron en células de la cepa de levaduras Y187 los vectores de expresión pACT2 y pGBT9, el primero de ellos, contiene el dominio de transactivación de GAL4 (GAL4AD) unido a los diferentes dominios de SHOX2, y pGBT9 contiene el dominio de unión al ADN del factor de transcripción GAL4 unido a la proteína SHOX salvaje. Como control positivo, se midió la intensidad de la interacción de las proteínas salvajes (columna negra); el resto de las interacciones se estimaron a partir de ese valor de referencia (100%). Como control negativo se empleó la interacción entre la proteína salvaje y sus correspondientes vectores vacíos. En la parte superior de cada columna aparece el valor de interacción. Los resultados del ensayo implican al HD y al OAR de SHOX2, como los dominios de interacción con SHOX.

2.2. Confirmación de la interacción de SHOX2 con SHOX mediante inmunoprecipitación en células humanas

La confirmación de la interacción de SHOX2 con SHOX se realizó mediante inmunoprecipitación en células humanas HEK293. Para ello, se sobre-expresaron las proteínas SHOX2 y SHOX unidas a los epítomos FLAG y HA, respectivamente, en células humanas HEK293. Los lisados nucleares de estas células se incubaron con agarosa unida al anticuerpo anti-FLAG, al inmunoprecipitar SHOX2, que está unido al epítomo FLAG, se arrastran aquellas proteínas que son capaces de interaccionar con SHOX2.

Se separaron las diferentes proteínas mediante western-blots, usando los anticuerpos, anti-SHOX2 y anti-SHOX, para detectarlas. SHOX sólo inmunoprecipita en presencia de SHOX2, confirmando en células humanas que SHOX2 interactúa con SHOX (Fig.20).

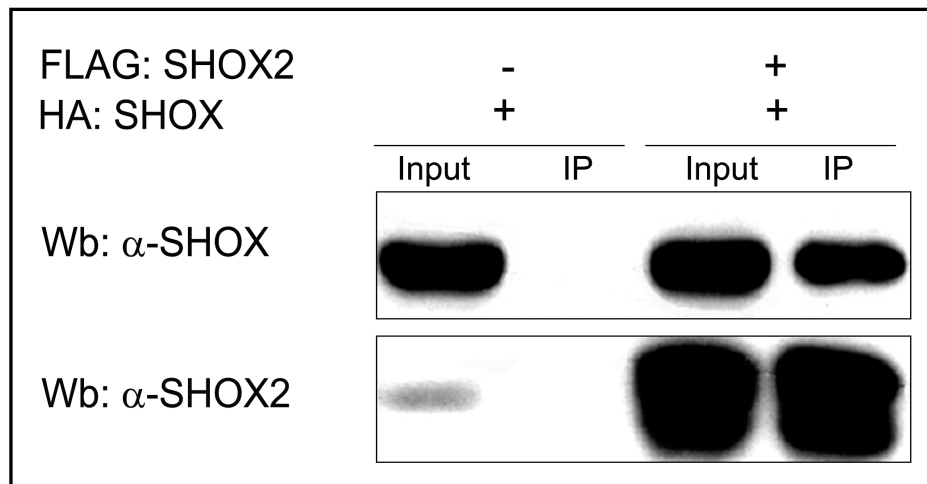


Figura 20. Inmunoprecipitación de las proteínas SHOX2 y SHOX en células humanas HEK293. Se sobreexpresaron las proteínas de estudio en células humanas HEK293. Las proteínas SHOX2 y SHOX están unidas a los epítomos FLAG y HA respectivamente. En el primer y tercer carril se han cargado los lisados nucleares de las proteínas SHOX2 y SHOX de las células transfectadas pero no inmunoprecipitadas, en el segundo y cuarto carril se cargaron las muestras inmunoprecipitadas (IP). En el segundo carril, se observa como SHOX no es capaz de inmunoprecipitar en ausencia de SHOX2, mientras que sí inmunoprecipita en presencia de SHOX2 (cuarto carril). Imagen cedida por Aza-Carmona, M.

3. IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON SHOX2

Para identificar si SHOX2 interacciona con las mismas proteínas que SHOX, siendo éstas, SHOX, SOX5, SOX6 y MAGED1, se llevó a cabo el ensayo del doble híbrido de levaduras con los ADNc humanos de las proteínas, usando como control positivo la homodimerización de SHOX2. Se midió la intensidad de la interacción de cada una de ellas en base a la proteína SHOX2 salvaje.

Los resultados revelaron que SHOX y SOX6 interaccionan de forma clara con SHOX2, mientras que la interacción entre SHOX2 y SOX5 ó MAGED1 es mucho más débil, en comparación con las anteriores (Fig. 21).

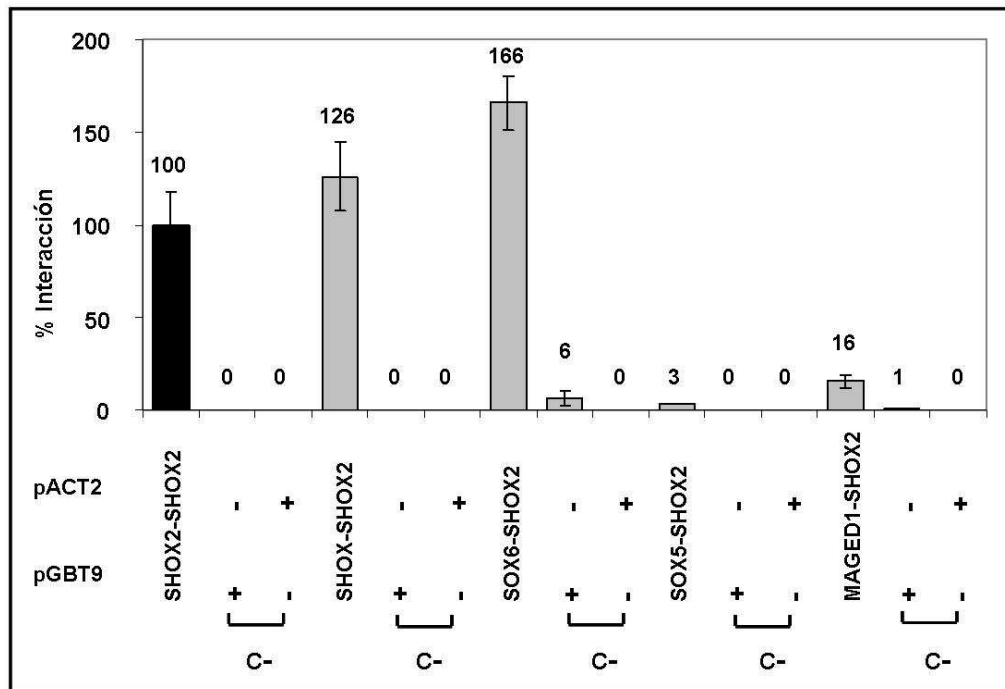


Figura 21. Identificación de las proteínas que interactúan con SHOX2. En este ensayo se clonaron los ADNc humanos de cada una de las proteínas en los dos vectores empleados para el doble híbrido. Por una parte, el ADNc de SHOX2 fue clonado en el vector pACT2, mientras que los ADNc del resto de las proteínas fueron clonados en el vector pGBT9. Junto a cada columna están indicadas las interacciones que se han analizado. Como control positivo de referencia se empleó el porcentaje de interacción de SHOX2-SHOX2 (columna negra), el resto de las interacciones se valoraron en función de este porcentaje. Como controles negativos, se emplearon las interacciones de cada una de las proteínas con su vector vacío, indicando con signo (+), la presencia de dicha proteína y con el símbolo (-), el vector correspondiente vacío. Los resultados revelan una interacción fuerte de SHOX2 con SHOX y SOX6, mientras que la interacción con SOX5 y MAGED1 es más débil.

3.1. Confirmación de la interacción de SHOX2 con las proteínas, SOX5, SOX6 y MAGED1 mediante inmunoprecipitación en células humanas

La confirmación de la interacción de SHOX2 con las diferentes proteínas, SOX5, SOX6 y MAGED1, se realizó mediante inmunoprecipitación en células humanas HEK293. A pesar de que la interacción obtenida entre SHOX2-SOX5 mediante el doble híbrido de levaduras es débil, decidimos realizar el ensayo de coimmunoprecipitación en células humanas debido a que los estudios obtenidos hasta el momento demuestran que SOX5 y SOX6 comparten un 93% de identidad a nivel de homeodominio y son redundantes en determinados tejidos (Lefebvre et al., 1998; 2002).

Para este ensayo, se sobre-expresaron las proteínas SHOX2 y SOX5, SOX6 ó MAGED1 unidas a los epítopos FLAG y HA respectivamente, en células humanas HEK293. Los lisados nucleares de estas células se incubaron con agarosa unida al anticuerpo anti-FLAG, al inmunoprecipitar SHOX2, unido al epítipo FLAG, se arrastran aquellas proteínas que son capaces de interaccionar con SHOX2. Con las muestras

inmunoprecipitadas y con los lisados nucleares, se realizaron varios western-blots, usando los anticuerpos anti-SHOX2, anti-SOX5, anti-SOX6- H95 y anti-NRAGE (Fig.22).

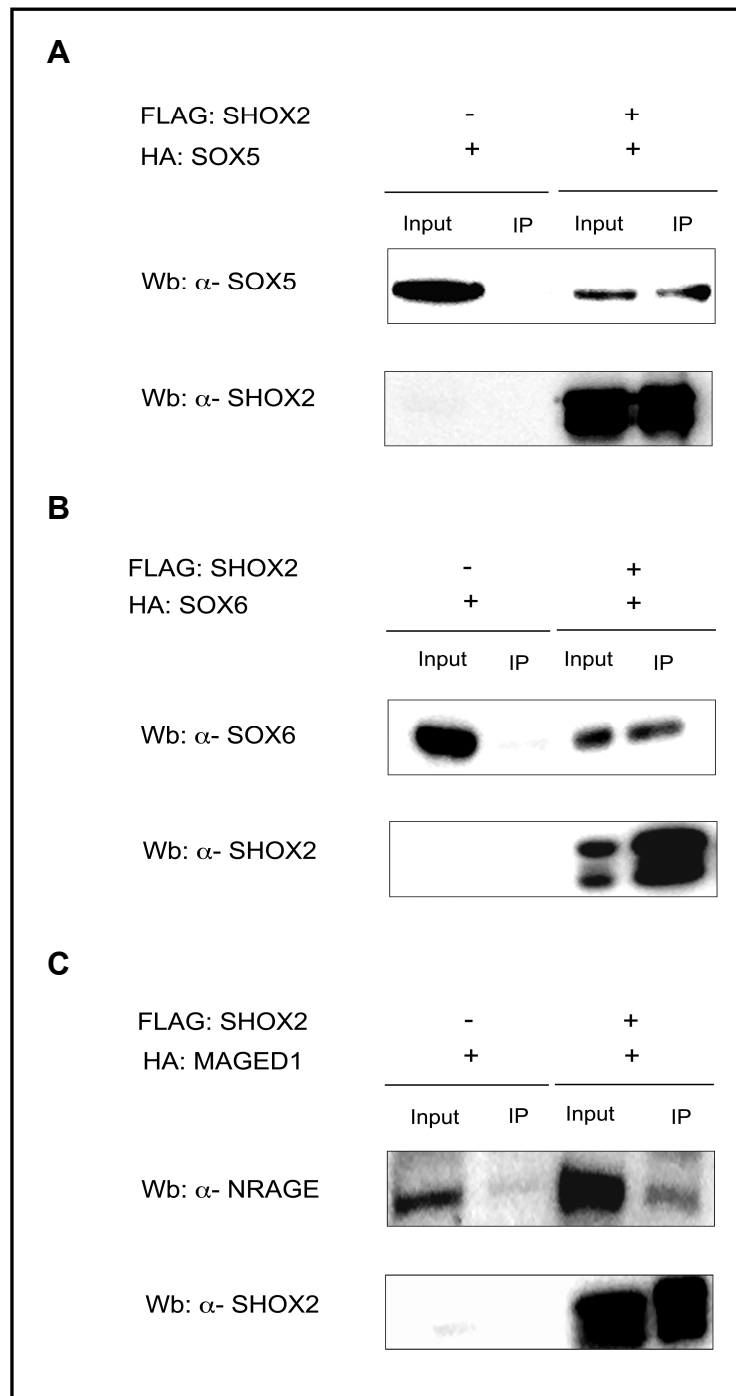


Figura 22. Inmunoprecipitación de SHOX2 con las proteínas, SOX5, SOX6 y MAGED1 en células humanas HEK293. Se sobreexpresaron las proteínas de estudio en células humanas HEK293. La proteína SHOX2 está unida al epítipo FLAG mientras que SOX5, SOX6 y MAGED1 están unidas al epítipo HA. En el primer y tercer carril se han cargado los lisados nucleares (Input) de las proteínas SHOX2, SOX5, SOX6 y MAGED1, en el segundo y cuarto carril se cargaron las muestras inmunoprecipitadas (IP). Se observa claramente, como SOX5 (A), SOX6 (B) y MAGED1 (C) (segundo carril) no son capaces de inmunoprecipitar en ausencia de SHOX2, mientras que sí inmunoprecipitan en presencia de SHOX2 (cuarto carril). Las primeras membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-SOX5 (A), anti-SOX6 (B) y anti-NRAGE y la segunda con el anti-SHOX2, demostrando la especificidad de los anticuerpos.

Tal y como demuestran los resultados, SOX5 solo es capaz de inmunoprecipitar en presencia de SHOX2, confirmando en células humanas que SHOX2 sí que interactúa con SOX5. Los resultados obtenidos para SOX6 son claros tanto en el doble híbrido de levaduras como en el ensayo de inmunoprecipitación puesto que SOX6 sólo inmunoprecipita en presencia de SHOX2, confirmando en células humanas, que SHOX2 interacciona también con SOX6 (Fig.22).

Al igual que con el doble híbrido, los resultados para la interacción entre SHOX2-MAGED1 no son tan claros como con las proteínas anteriores. Podemos observar como MAGED1 sólo inmunoprecipita en presencia de SHOX2, pero la inmunoprecipitación entre ellos es más débil. Esto puede ser debido a que MAGED1 es una proteína pro-apoptótica, cuya concentración en la célula está sometida a procesos de degradación proteosómica, lo que ha dificultado en algunos casos su sobre-expresión (Fig.22).

4. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE SHOX2 CON SOX6

Como se ha comentado anteriormente, debido a que SOX5 y SOX6 son redundantes y su expresión está solapada en muchos tejidos (Lefebvre et al., 1998) la caracterización del dominio de interacción de estas proteínas con SHOX2, se llevó a cabo únicamente en SOX6, asumiendo que el dominio de interacción de SOX6 coincide con el dominio de SOX5, debido a su redundancia funcional.

4.1. Localización del dominio de SHOX2 implicado en la interacción con SOX6

Para identificar que región de SHOX2 interacciona con SOX6 se midió, en el sistema del doble híbrido de levaduras, la intensidad de la interacción de los clones parciales de SHOX2, que contienen sus diferentes dominios, con la proteína SOX6 salvaje, usando como control positivo la interacción de SHOX2 con SOX6 (Fig.23).

Los resultados demuestran que existen tres clones que son capaces de interaccionar con la proteína SOX6 salvaje: SHOX2 (1-199), SHOX2 (140-199) y SHOX2 (140-331) (Fig.23). Todos ellos contienen el homeodominio. El clon SHOX2 (140-331), que interacciona incluso con más fuerza que con la proteína SOX6 salvaje, contiene además del homeodominio, el dominio de transactivación, sugiriendo que este dominio confiere estabilidad estructural a la proteína. La ausencia de interacción del clon SHOX2 (199-331) que contiene el OAR, y la interacción del clon SHOX2 (140-199), que contiene únicamente el homeodominio, implicaría directamente al homeodominio de SHOX2 como la región que interacciona con SOX6 (Fig.23).

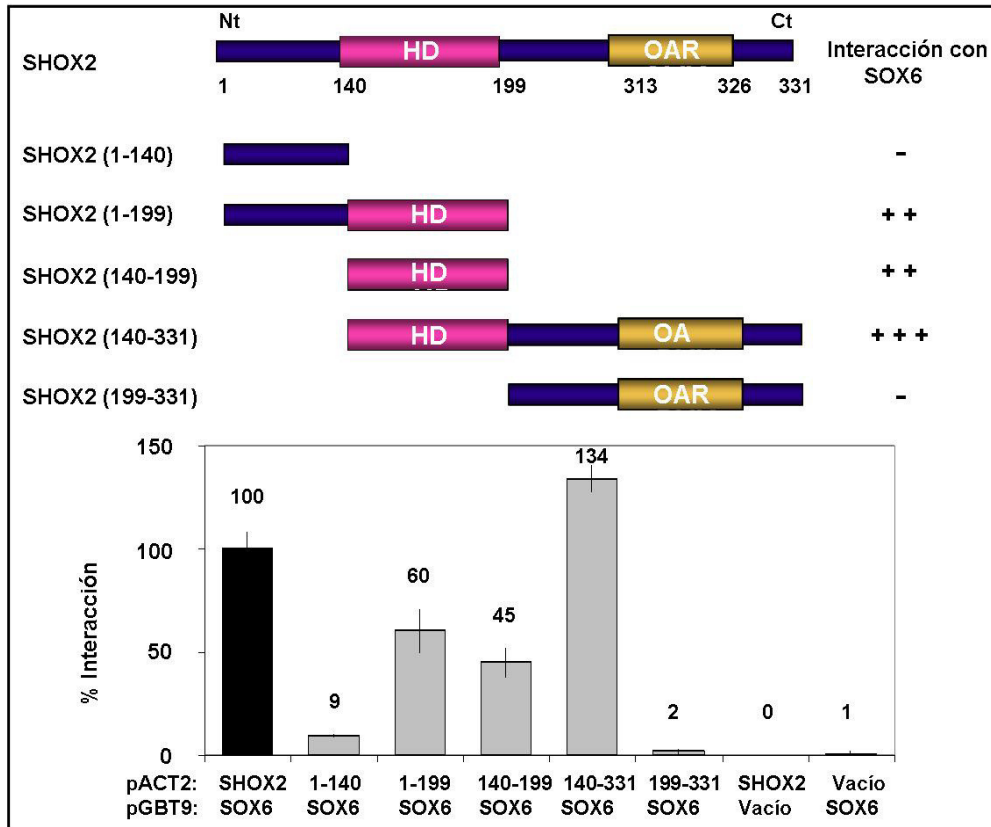


Figura 23. Identificación del dominio de SHOX2 implicado en la interacción con SOX6. En la imagen superior se observa la proteína SHOX2 completa, indicando las coordenadas de los aminoácidos que limitan cada región. El dominio HD, se corresponde con el homeodominio de la proteína, y el OAR, con el dominio de transactivación. La intensidad de la interacción viene marcada por los símbolos (+). Se cotransformaron en células de la cepa de levaduras Y187 los vectores de expresión pACT2 y pGBT9, el primero de ellos, contiene el dominio de transactivación de GAL4 (GAL4AD) unido a los diferentes dominios de SHOX2, y pGBT9 contiene el dominio de unión al ADN del factor de transcripción GAL4 unido a la proteína SOX6 salvaje. Como control positivo, se midió la intensidad de la interacción de las proteínas salvajes (columna negra), la intensidad del resto de las interacciones se estimó a partir de ese valor de referencia (100%). Como controles negativos se observó la interacción entre las proteínas salvajes y sus correspondientes vectores vacíos. Sobre cada una de las columnas aparece el valor del porcentaje de interacción observado. En la imagen podemos observar como SHOX2 interacciona con SOX6 a través del HD debido a la interacción de los clones, SHOX2 (140-331), SHOX2 (140-199) y SHOX2 (1-199).

Para validar la identidad del dominio de SHOX2 implicado en la interacción con SOX6 se evaluó la capacidad de interacción de un grupo de mutaciones puntuales localizadas a lo largo de SHOX2, mediante el doble híbrido de levaduras (Fig.24). Todas las mutaciones que se encuentran localizadas en el homeodominio (p.L155V, p.A193P y p.R196C), disminuyen la capacidad de interacción con SOX6 a valores < 50%. Además la mutación p.K139E, localizada en el aminoácido lindante con el homeodominio, reduce también su capacidad de interacción (Fig.24). Por tanto, los resultados obtenidos con los clones que contienen las diferentes mutaciones de SHOX2, confirman que el homeodominio está implicado en la interacción de SHOX2-SOX6.

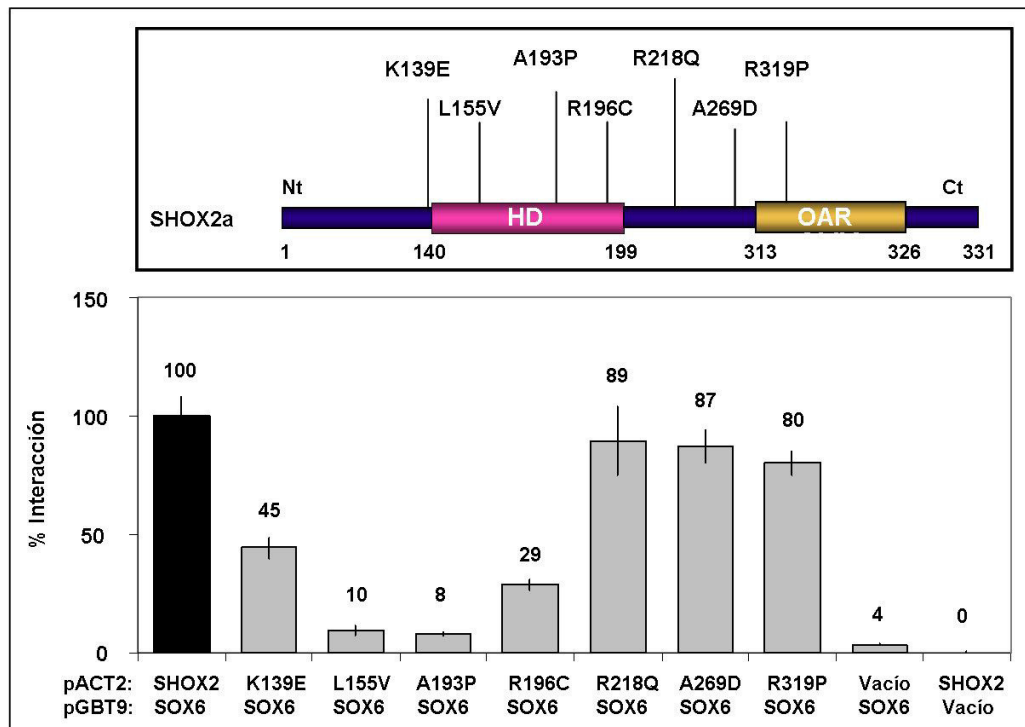


Figura 24. Análisis de la capacidad de interacción con SOX6 de diferentes mutaciones puntuales de SHOX2. Las mutaciones estudiadas se generaron por mutagénesis dirigida y están distribuidas en las diferentes regiones de SHOX2. Mediante el ensayo de doble híbrido de levaduras, se cotransformaron células en la cepa Y187 con vectores que expresan el dominio de unión al ADN de GAL4 (pGBT9) unido a la proteína SOX6 salvaje o el dominio de transactivación de GAL4 (pACT2) unido a las proteínas mutantes de SHOX2. Como control negativo se midió la intensidad de la interacción de cada proteína con los vectores vacíos y como control positivo la interacción de las proteínas salvajes (columna negra). La capacidad de interacción de SOX6 con las diferentes mutaciones de SHOX2 se compara con respecto al valor de referencia (100%), que corresponde a la interacción entre ambas proteínas salvajes. Todas las mutaciones localizadas en el HD disminuyen la capacidad de interacción con SOX6 a valores inferiores al 50%, implicando a éste como el dominio de SHOX2 que interacciona con SOX6. HD=Homeodominio, OAR=dominio de transactivación.

4.2. Identificación del dominio de SOX6 implicado en la interacción con SHOX2

Con el propósito de identificar el dominio de SOX6 implicado en la interacción con SHOX2, se llevó a cabo el ensayo del doble híbrido de levaduras empleando clones parciales que contenían las diferentes regiones de SOX6.

Se midió la intensidad de la interacción de cada uno de los clones parciales de SOX6 con la proteína SHOX2 salvaje.

Sólo hay dos clones, SOX6 (263-787) y SOX6 (479-787) que son capaces de interaccionar con la proteína SHOX2 salvaje, ambos contienen el HMG. El clon SOX6 (263-787) que contiene el HMG, es capaz de interaccionar incluso con más fuerza que la proteína SOX6 salvaje, este clon contiene además del HMG, la 2ª *coiled-coil* (Fig.25). La interacción del clon SOX6 (479-787), que contiene únicamente el HMG, y la ausencia total de interacción del clon SOX6 (263-577), que contiene únicamente la 2ª *coiled-coil*, implican directamente al HMG como el dominio de SOX6 que interacciona con SHOX2.

Se puede asumir que la presencia de la 2ª *coiled-coil* y la región comprendida entre ésta y el HMG, le confieren una alta estabilidad estructural. Por todo esto, los resultados indican de forma contundente que el HMG de SOX6 es el dominio implicado en la interacción con SHOX2.

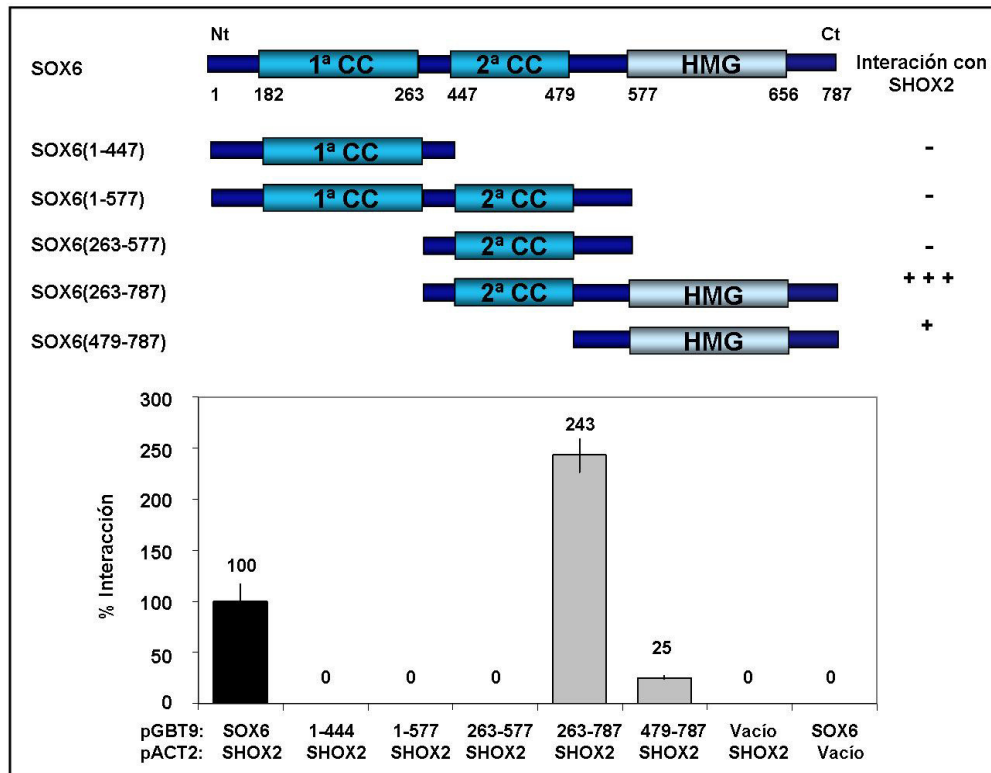


Figura 25. Identificación del dominio de SOX6 implicado en la interacción con SHOX2. En la imagen de la parte superior se observa la proteína SOX6 completa. Bajo cada dominio, se consignan las coordenadas de los aminoácidos implicados. La proteína SOX6 consta de diferentes dominios: 1ª CC y 2ª CC, dominios *coiled coil*, HMG: High Mobility Group. La intensidad de la interacción está marcada con los símbolos (+). Se cotransformaron en células de la cepa de levaduras Y187 los vectores de expresión pACT2 y pGBT9, el primero de ellos, contiene el dominio de transactivación de GAL4 (GAL4AD) unido a la proteína SHOX2 salvaje, y pGBT9 contiene el dominio de unión al ADN del factor de transcripción GAL4 unido a los diferentes dominios de SOX6. Como control positivo de referencia, se midió la intensidad de la interacción de las proteínas salvajes (columna negra), el resto de las interacciones se estimaron relativamente a ese valor de referencia (100%). Como controles negativos se hicieron interaccionar las proteínas salvajes con los vectores vacíos. Sobre cada columna aparece el valor estimado de interacción. La fuerte interacción del clon SOX6 (263-787) que contiene el HMG, implica a este dominio en la interacción con SHOX2.

5. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE SHOX2 CON MAGED1

5.1. Identificación del dominio de interacción de SHOX2 con MAGED1

Para poder identificar cual es el dominio de SHOX2 implicado en la interacción con MAGED1, se clonaron las diferentes regiones de SHOX2 en los vectores del doble híbrido de levaduras y se midió la intensidad de la interacción de cada uno de los diferentes dominios con la proteína MAGED1 salvaje. Sólo hay tres clones, SHOX2

(140-199), SHOX2 (140-331) y SHOX2 (199-331) que son capaces de interactuar con la proteína MAGED1. El clon SHOX2 (140-331) presenta una intensidad de interacción muy superior a la interacción de SHOX2 con la proteína MAGED1 salvaje. Este clon contiene tanto el homeodominio como el dominio de transactivación. En comparación, los otros dos clones, SHOX2 (140-199) y SHOX2 (199-331), que contienen el homeodominio y el OAR respectivamente, interactúan de manera más débil. (Fig.26). El hecho de que el clon SHOX2 (1-199) presente una débil interacción a pesar de contener el HD, nos indica que la región N-terminal le confiere una fuerte inestabilidad a la proteína. Por tanto, el homeodominio y el dominio de transactivación de SHOX2, son los dominios que intervienen en la interacción con MAGED1.

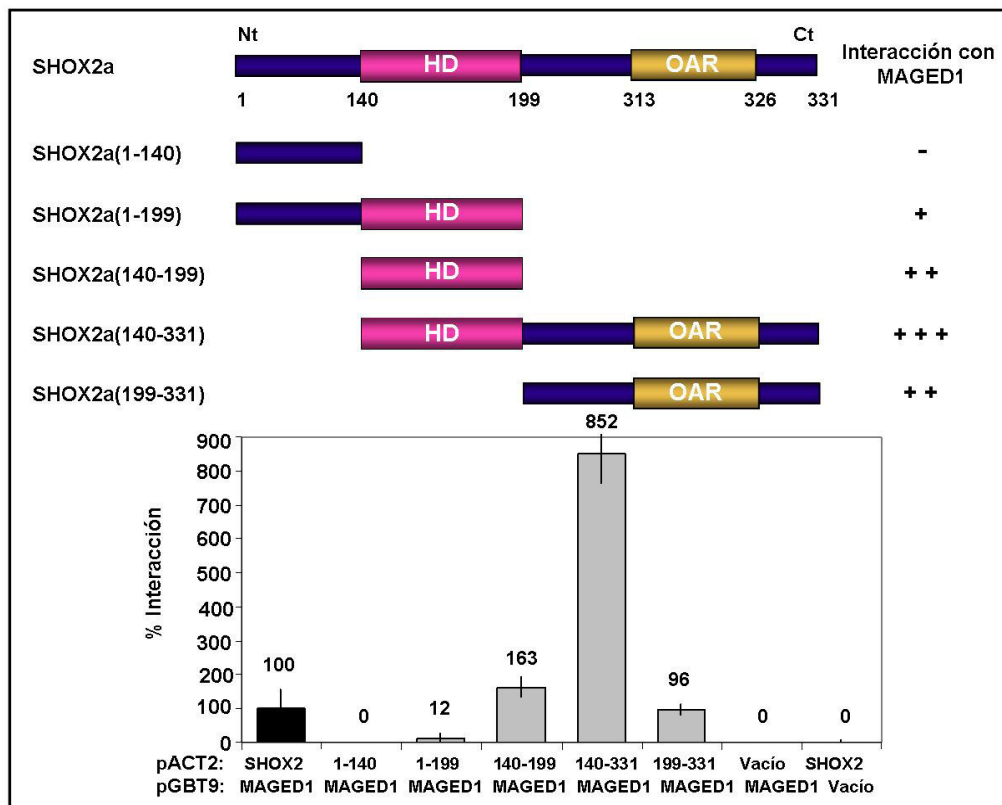


Figura 26. Identificación del dominio de SHOX2 implicado en la interacción con MAGED1. En la imagen superior se observa la proteína SHOX2 completa y los aminoácidos que delimitan cada dominio. Cada dominio fue clonado en los diferentes vectores del doble híbrido. El HD, se corresponde con el homeodominio de la proteína, y el OAR, con el dominio de transactivación. La intensidad de la interacción viene marcada con los símbolos (+). Se cotransformaron en células de la cepa de levaduras Y187 los vectores de expresión pACT2 y pGBT9, el primero de ellos, contiene el dominio de transactivación de GAL4 (GAL4AD) unido a los diferentes dominios de SHOX2 y pGBT9 contiene el dominio de unión al ADN del factor de transcripción GAL4 unido a la proteína MAGED1 salvaje. Como control positivo se midió la intensidad de la interacción de las proteínas salvajes (columna negra); la intensidad del resto de las interacciones se estimaron a partir de ese valor de referencia (100%). Como controles negativos se hicieron interaccionar las proteínas salvajes con los vectores vacíos. Sobre cada columna aparece el valor observado de interacción. Como podemos observar en la gráfica, la intensidad de interacción del clon SHOX2 (140-331) que contiene el HD y el OAR, y la interacción de los clones, SHOX2 (140-199) y SHOX2 (199-331), que contienen el HD y el OAR, respectivamente, implican a ambos dominios en la interacción con MAGED1.

A pesar de que los resultados obtenidos en el ensayo anterior no fueron muy concluyentes, decidimos intentar estudiar la región de interacción entre SHOX2 y MAGED1 mediante la evaluación del efecto de diferentes mutaciones puntuales, localizadas a lo largo de los diferentes dominios de SHOX2, sobre su capacidad de interacción con la proteína MAGED1 salvaje (Fig.27).

Sólo la mutación p.R218Q, localizada en la región intermedia entre el homeodominio y el OAR, fue capaz de reducir el porcentaje de interacción a valores <50%. El resto de las mutaciones no afectaron su capacidad de interacción, incluso alguna de ellas, p.L155V, p.A193P y p.R196C, aumentaron su capacidad de interacción a valores muy superiores a la interacción mostrada con la proteína SHOX2 salvaje (Fig.27). Estos resultados no nos permiten confirmar cual es la región exacta de SHOX2 implicada en la interacción con MAGED1.

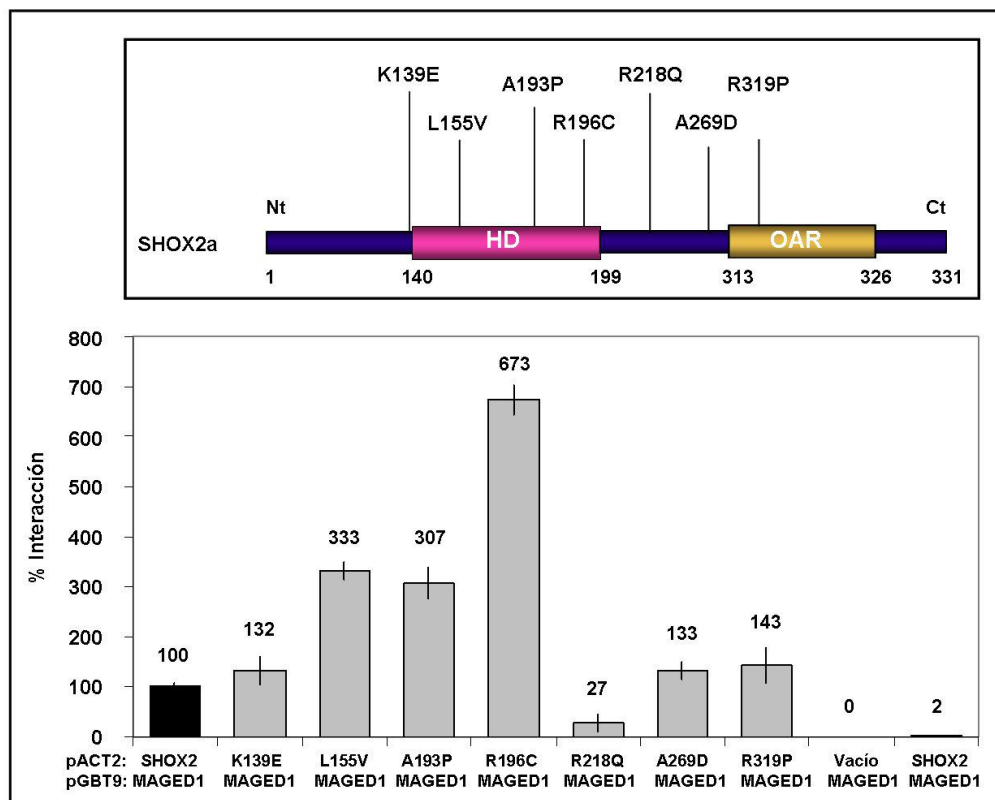


Figura 27. Análisis del efecto de diferentes mutaciones puntuales de SHOX2 sobre su capacidad de interacción de MAGED1. Las mutaciones estudiadas se obtuvieron por mutagénesis dirigida y están distribuidas en los diferentes dominios de SHOX2. Se indican los distintos dominios y las coordenadas de los aminoácidos que los constituyen. Se cotransformaron células de levaduras de la cepa Y187 con vectores que expresan el dominio de unión al ADN de GAL4 (pGBT9) unido a la proteína MAGED1 salvaje o el dominio de transactivación de GAL4 (pACT2) unido a las proteínas mutantes de SHOX2. Como control negativo se midió la intensidad de la interacción de cada proteína con los vectores vacíos y como control positivo la interacción de las proteínas salvajes (columna negra). La capacidad de interacción de MAGED1 con las diferentes mutaciones de SHOX2 se compara con el valor de referencia (100%), correspondiente a la interacción de ambas proteínas. HD; Homeodominio, OAR; dominio de transactivación. Los resultados en este caso no nos aportan datos concluyentes.

Basándonos en los resultados anteriores, podríamos postular que la interacción entre ambas proteínas se produciría entre el homeodominio y el dominio de transactivación y que la región comprendida entre ambos dominios jugaría un papel fundamental en la estabilización de dicha interacción.

5.2. Identificación del dominio de MAGED1 implicado en la interacción con SHOX2

Para determinar el dominio de MAGED1 implicado en la interacción con SHOX2, se clonaron en los vectores del doble híbrido de levaduras los diferentes dominios de MAGED1 y posteriormente, se evaluó la intensidad de la interacción de cada uno de ellos con la proteína SHOX2 salvaje.

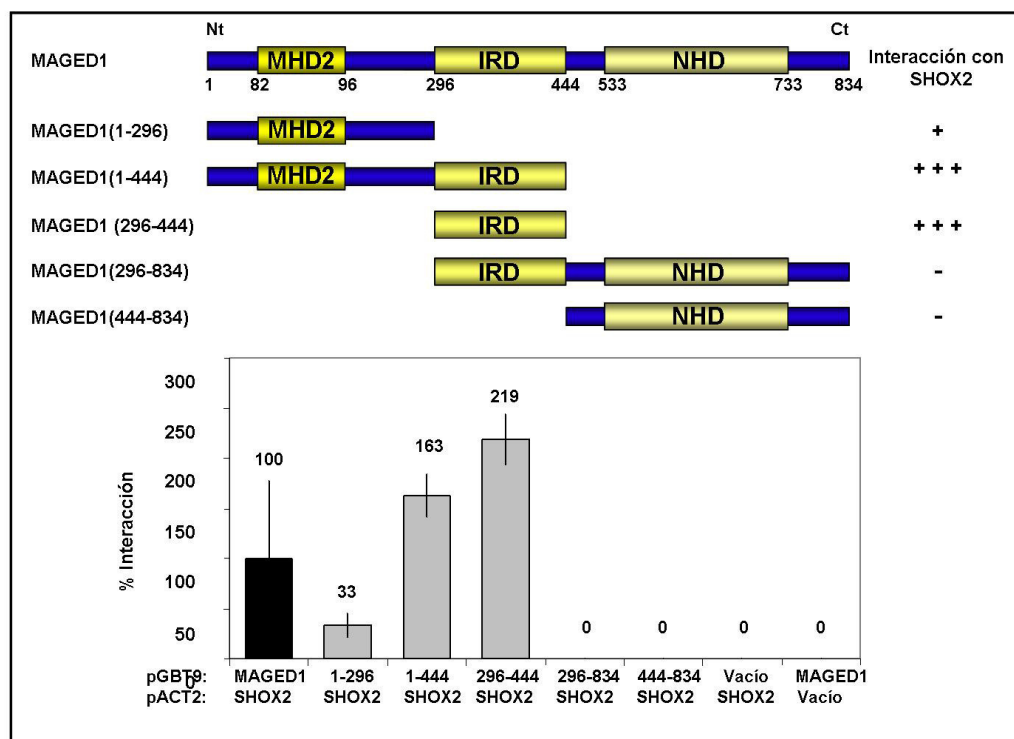


Figura 28. Identificación del dominio de MAGED1 implicado en la interacción con SHOX2. En la imagen superior se observa la proteína MAGED1 completa, con sus correspondientes dominios y las coordenadas de los aminoácidos que los delimitan. El MHD2, se corresponde con el dominio de homología MAGE, cuya función es desconocida, IRD, es el dominio de repeticiones entremezcladas, y finalmente el NHD, es el dominio implicado en la interacción con otras proteínas. La intensidad de la interacción está determinada por los símbolos (+). Se cotransformaron en células de la cepa de levaduras Y187 los vectores de expresión pACT2 y pGBT9, el primero de ellos, contiene el dominio de transactivación de GAL4 (GAL4AD) unido a la proteína SHOX2 salvaje y pGBT9 contiene el dominio de unión al ADN del factor de transcripción GAL4 unido a los diferentes dominios de MAGED1. Como control positivo se midió la fuerza de interacción de las proteínas salvajes (columna negra), el resto de las interacciones se estimaron a partir de ese valor de referencia (100%). Como controles negativos se hicieron interaccionar las proteínas salvajes con los vectores vacíos. Sobre cada columna aparece el valor de interacción estimado. La intensidad de interacción de los clones parciales de MAGED1 demuestra que el dominio de interacción con SHOX2 es el dominio de repeticiones entremezcladas, IRD.

En primer lugar, los resultados descartaron de forma clara, que el dominio NHD estuviera implicado en la interacción, puesto que ninguno de los dos clones que lo

contienen, MAGED1 (296-834) y MAGED1 (444-834), interacciona con la proteína SHOX2.

En cambio, la fuerte interacción observada con el clon MAGED1 (296-444) implica de forma contundente, que el dominio de repeticiones entremezcladas, IRD, es el responsable de la interacción entre ambas proteínas (Fig.28). Es importante destacar por una parte, que el clon MAGED1 (296-834) conteniendo el IRD, además del dominio NHD, no sea capaz de interaccionar con SHOX2, sugiriendo que este dominio inestabiliza al IRD en su interacción con SHOX2 (Fig.28).

Y por otra, que la interacción observada por el clon MAGED1 (1-444) que contiene además del IRD, el dominio MHD2, sugiere que este dominio aporta estabilidad estructural a la interacción.

Por tanto, el dominio proteico de MAGED1 implicado en la interacción con SHOX2, es el dominio de repeticiones entremezcladas, IRD.

6. COEXPRESIÓN DE SHOX, SOX5, SOX6, SOX9 y MAGED1 CON SHOX2 EN LA PLACA DE CRECIMIENTO HUMANA

Estudiamos si las proteínas, SHOX, SOX5, SOX6, SOX9 y MAGED1 están coexpresadas junto con SHOX2 en la placa de crecimiento humana, mediante inmunohistoquímica. El análisis de la expresión se realizó en la placa de crecimiento de fetos humanos de diferentes semanas de gestación. Hemos contado con muestras seriadas de tibia y costilla de 18, 27, 32 y 38 semanas de gestación (secciones de tibia humana en los fetos de 18 y 27 semanas y secciones de costilla en los fetos de 32 y 38 semanas).

SHOX2 se expresa con fuerte intensidad tanto en condrocitos de reserva como proliferativos e hipertróficos desde la semana 18 hasta la semana 38 de gestación (Fig.29).

Al igual que SHOX2, todas las proteínas, SHOX, SOX5, SOX6, SOX9 y MAGED1, se expresan con la misma intensidad tanto en condrocitos de reserva como proliferativos e hipertróficos, en las placas de crecimiento de 18 semanas (Fig.30 y 32) y 38 semanas de gestación (Fig.31 y 33). Sólo existen diferencias a nivel de expresión con SOX5. Su expresión es fuerte en los condrocitos de reserva y proliferativos de ambas placas de crecimiento, pero es más débil en los condrocitos hipertróficos de la placa de crecimiento del feto de 18 semanas de gestación (Fig.30), no siendo así en el feto de 38 semanas, en donde su intensidad en los condrocitos hipertróficos es igual al resto de las zonas de la placa de crecimiento (Fig.31).

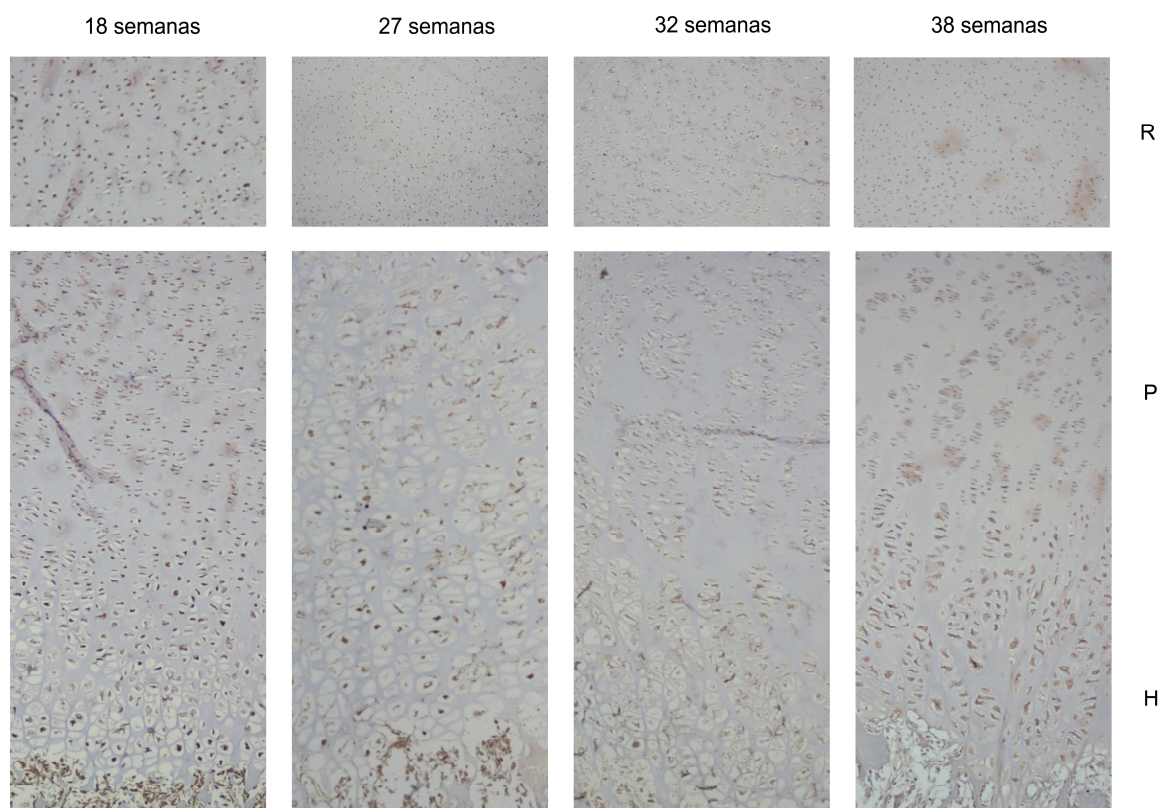


Figura 29. Expresión de SHOX2 en la placa de crecimiento humana. Análisis de expresión de proteínas mediante inmunohistoquímica en secciones de tibia y costilla de fetos humanos de diferentes semanas de gestación. Se puede observar expresión de SHOX2 en todas las zonas de la placa de crecimiento. Las fotos fueron realizadas a 20 aumentos.

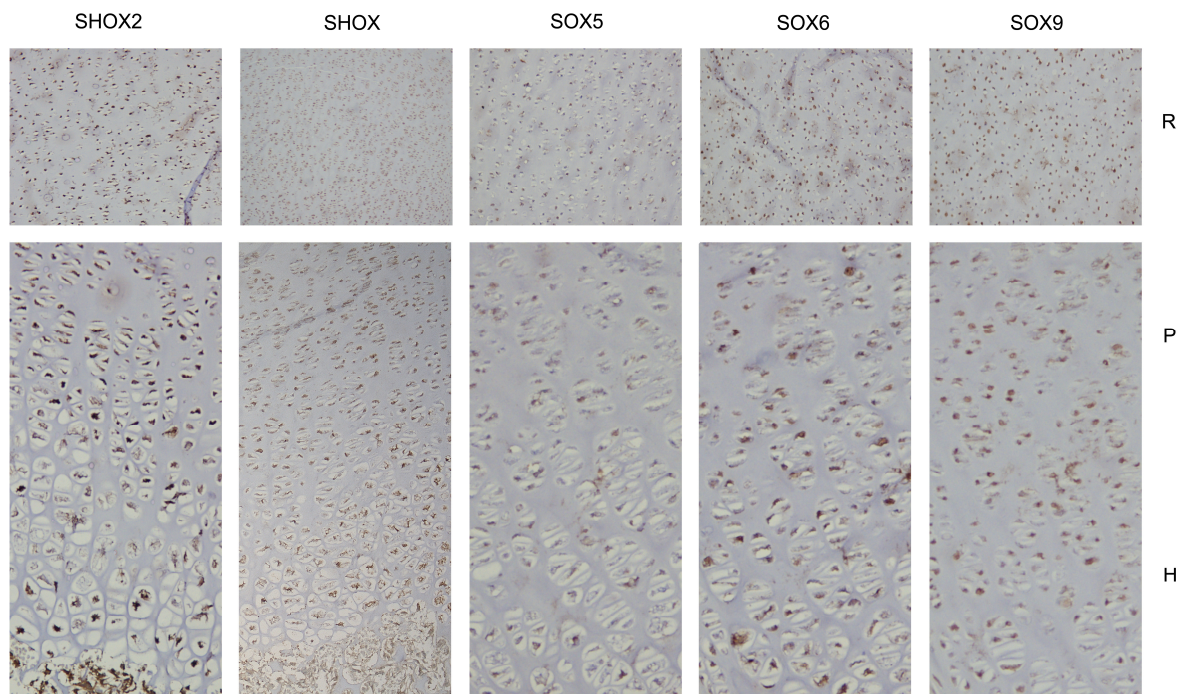


Figura 30. Expresión de SHOX2, SHOX, SOX5, SOX6 y SOX9 en la placa de crecimiento humano de 18 semanas de gestación. Análisis de la expresión de las proteínas en estudio mediante inmunohistoquímica en secciones de tibia y costilla de feto humano de 18 semanas de gestación. Se puede observar que SHOX2 y las diferentes proteínas, SHOX, SOX5, SOX6 y SOX9, se expresan en todas las zonas de la placa de crecimiento, observándose expresión tanto en condrocitos hipertróficos como proliferativos y de reserva. La expresión de SOX5 es más débil en los condrocitos hipertróficos. Las fotos fueron realizadas a 20 aumentos.

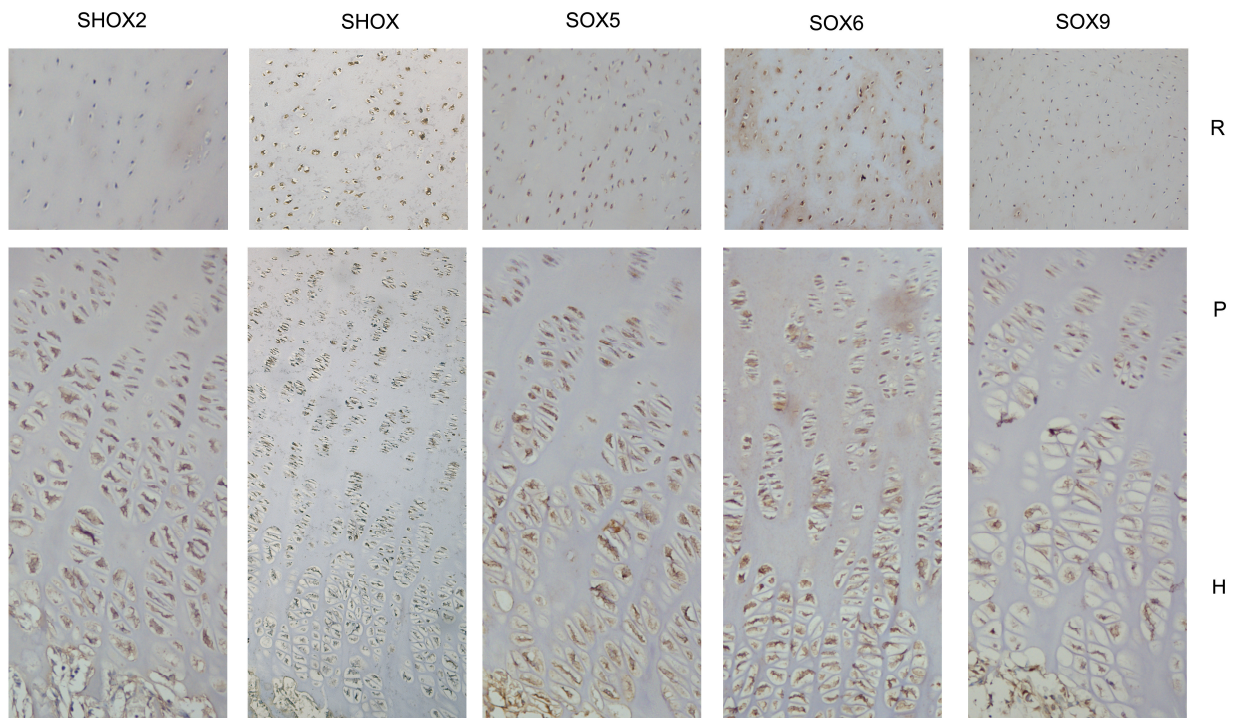


Figura 31. Expresión de SHOX2, SHOX, SOX5, SOX6 y SOX9 en la placa de crecimiento humano de 38 semanas. Análisis de la expresión de las proteínas de interés mediante inmunohistoquímica en secciones de costilla de feto humano de 38 semanas de gestación. Se puede observar que SHOX2 y las diferentes proteínas, SHOX, SOX5, SOX6 y SOX9, se expresan en todas las zonas de la placa de crecimiento, observándose con la misma intensidad tanto en condrocitos hipertróficos como proliferativos y de reserva. Las fotos fueron realizadas a 20 aumentos.

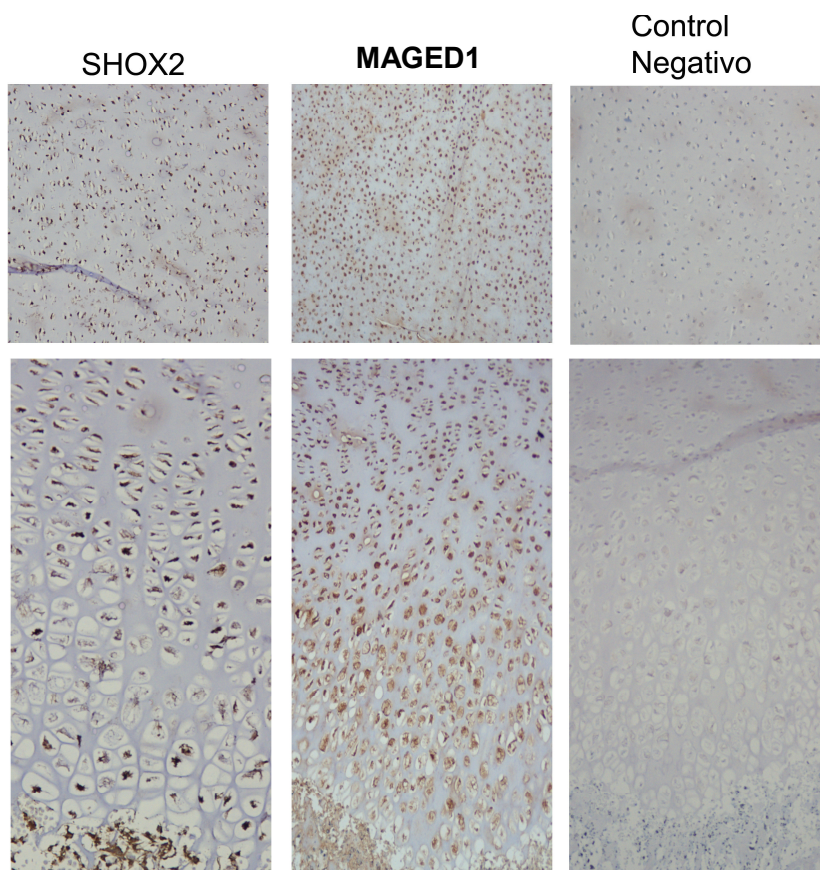


Figura 32. Expresión de SHOX2 y MAGED1 en la placa de crecimiento humana de 18 semanas de gestación. Análisis de la expresión de SHOX2 y MAGED1 mediante inmunohistoquímica en secciones de tibia y costilla de un feto humano de 18 semanas de gestación. Se detecta expresión de SHOX2 y MAGED1 en todas las zonas de la placa de crecimiento, observándose con la misma intensidad tanto en condrocitos hipertróficos como proliferativos y de reserva. Como control negativo, el anticuerpo primario fue sustituido por PBS. Las fotos fueron realizadas a 20 aumentos.

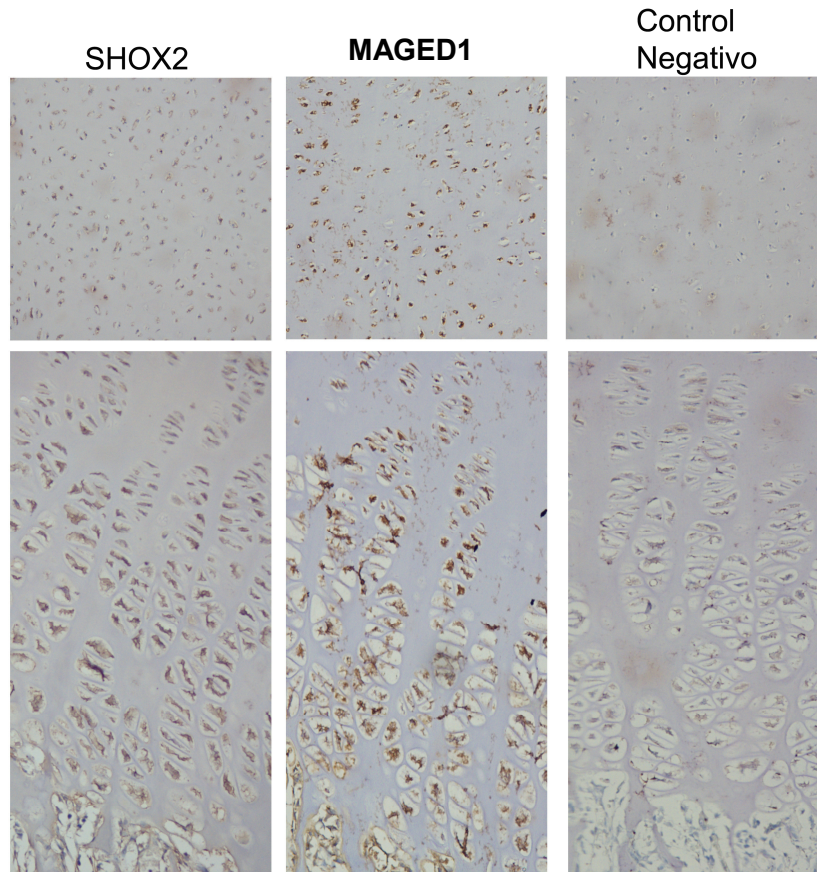


Figura 33. Expresión de SHOX2 y MAGED1 en la placa de crecimiento humana de 38 semanas de gestación. Análisis de la expresión mediante inmunohistoquímica en secciones de costilla de un feto humano de 38 semanas de gestación. Se detecta expresión de SHOX2 y MAGED1 en todas las zonas de la placa de crecimiento, observándose con la misma intensidad tanto en condrocitos hipertróficos como proliferativos y de reserva. Las fotos fueron realizadas a 20 aumentos. Como control negativo, el anticuerpo primario fue sustituido por PBS.

7. ANÁLISIS MUTACIONAL

7.1. Análisis mutacional de SOX5 y SOX6

Se realizó un rastreo de mutaciones puntuales y pequeñas delecciones ó inserciones en el gen SOX5 (n=56) y en el gen SOX6 (n=79) en pacientes diagnosticados con DLW/DML sin defecto molecular conocido en *PAR1*. Se analizaron las regiones codificantes y las regiones de transición intrón-exón mediante amplificación por PCR de las secuencias codificantes y transiciones intrón/exón y secuenciación.

Además, se realizó un análisis de delecciones y duplicaciones del gen SOX6 mediante marcadores microsatélites y MLPA.

No se encontraron mutaciones en ninguno de los dos genes en los pacientes estudiados.

8. IDENTIFICACIÓN DE LAS POSIBLES DIANAS TRANSCRIPCIONALES DE SHOX2

Hasta la fecha son tres las dianas de transcripción conocidas del gen *SHOX*: *NPPB* (Marchini et al., 2007), *FGFR3* (Decker et al., 2011) y *ACAN* (Aza-Carmona et al., 2011). Debido a la alta similitud a nivel de proteína entre SHOX y SHOX2, decidimos postular estos genes como posibles dianas transcripcionales de SHOX2.

Además, debido al importante papel del trío SOX en la activación de *ACAN* (Aza-Carmona et al., 2011), y por su importancia como proteína de la matriz extracelular, nos llevó también a proponer a *Col2a1*, otra proteína que interactúa con el trío SOX (Lefebvre et al., 1998) como otra posible diana de SHOX2.

8.1. Investigación de *NPPB* como posible diana transcripcional de SHOX2

8.1.1. SHOX2 activa directamente al promotor de *NPPB* en células de osteosarcoma humano

Para demostrar que *NPPB*, diana directa de SHOX (Marchini et al., 2007), es una diana transcripcional de SHOX2 se llevó a cabo un ensayo de luciferasa en células de osteosarcoma humano, U2OS. Para ello, se cotransfectaron las células con SHOX2 introducido en un plásmido de expresión y la región promotora de *NPPB* en el plásmido reportero de la luciferasa, pGL3Basic-*NPPB*, usando SHOX como control positivo. Además de estos vectores, se incluyeron en el estudio dos mutantes de SHOX2 p.L155V y p.Q234X. El primero de ellos, se corresponde con la mutación p.L132V de SHOX, hallada en pacientes con DLW (Schneider et al., 2005), y localizada en el homeodominio de la proteína. La segunda mutación se eligió por ser homóloga a p.Q211X de SHOX, que carece del dominio de transactivación.

Los resultados demuestran de forma clara, que la sobreexpresión de SHOX2 activa directamente al promotor de *NPPB*, con un incremento de 9.5 veces en la actividad de luciferasa con respecto a las células que no sobreexpresan SHOX2 (Fig.34). Este incremento producido por SHOX2 sobre el promotor de *NPPB*, es incluso superior al producido por SHOX en esta misma región. Además, la activación de *NPPB* se ve drásticamente reducida al sobre-expresar los mutantes p.L155V y p.Q234X (Fig.34).

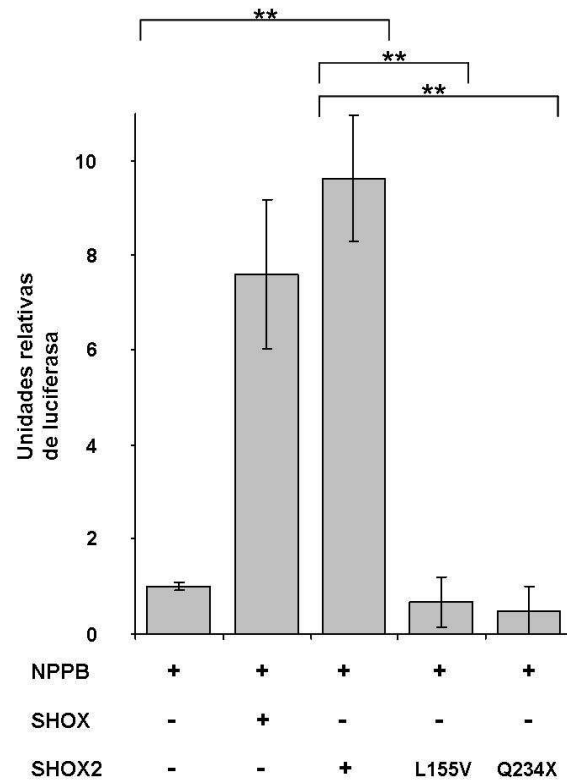


Figura 34. Activación del promotor de *NPPB* por *SHOX2* y *SHOX*. Ensayo de luciferasa en células U2OS transfectadas con los plásmidos reporteros pGL3Basic-*NPPB*, con el plásmido control de luciferasa “Renilla”, plásmido pRL-TK y diferentes combinaciones de plásmidos de expresión, pHA-SHOX, pHA-SHOX2 y pHA-SHOX2-p.L155V y pHA-SHOX2-p.Q234X. Los resultados demuestran que SHOX2 es capaz de transactivar el promotor de *NPPB*. Ambas mutaciones reducen drásticamente la actividad de luciferasa. Los valores representan la media \pm DE de tres réplicas biológicas; cada réplica representa la media de tres ensayos de luciferasa por transfección. Los asteriscos muestran que los valores son estadísticamente significativos ($p^{**} < 0.001$).

8.1.2. Función de SHOX2 y del trío SOX en la activación del promotor de *NPPB*

El dato de que SHOX coopera con el trío SOX en la activación del *enhancer* de *ACAN* (Aza-Carmona et al., 2011) nos llevó a investigar si SHOX2 es capaz de cooperar con el trío SOX en la activación del promotor de *NPPB*. Para poder analizar el papel que desempeñan los cofactores, SOX5, SOX6 y SOX9 junto con SHOX2 sobre dicha activación, se llevó a cabo el ensayo de luciferasa en células de osteosarcoma humano U2OS, empleando vectores de expresión que contenían los diferentes cofactores y el vector reportero de la luciferasa, pGL3Basic-*NPPB*.

La sobreexpresión de SHOX2 y SOX5 provoca un incremento de la activación de *NPPB* en 8.5 veces sobre la actividad del plásmido que contiene únicamente SHOX2. Por su parte, la sobreexpresión de SOX6 junto con SHOX2, aumenta su actividad a valores incluso superiores, viéndose un aumento de 16 veces sobre la actividad del plásmido que contiene únicamente SHOX2 (Fig.35). Pero sorprendentemente, la expresión de SOX9, bien sea por sí solo o en combinación con SHOX2, SOX5 y SOX6,

disminuye drásticamente los niveles de luciferasa, inhibiendo la activación del promotor de *NPPB* y actuando como represor del mismo (Fig.35).

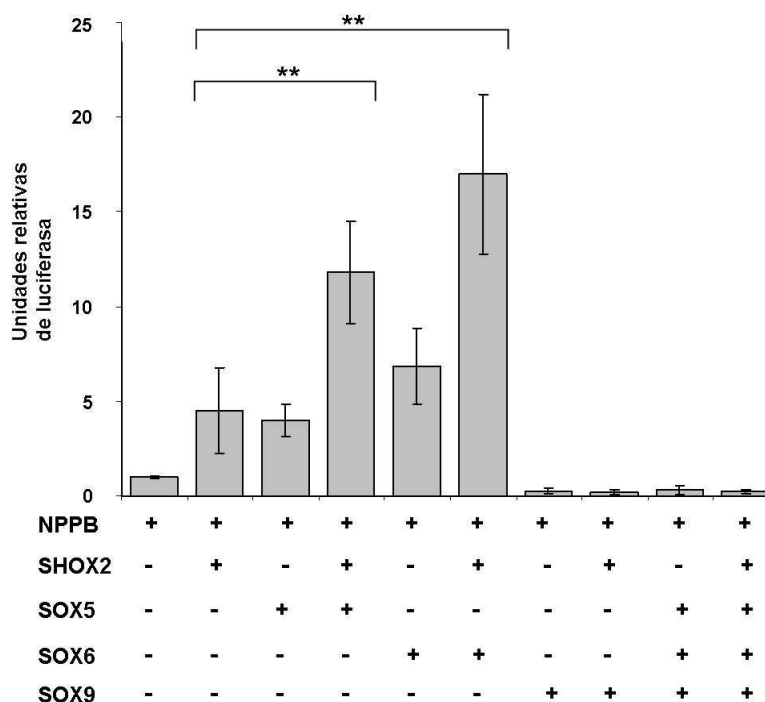


Figura 35. Estudio de la función de SHOX2 junto con el trío SOX sobre el promotor de *NPPB*. Ensayo de luciferasa en células U2OS transfectadas con los plásmidos reporteros pGL3Basic-*NPPB*, con el plásmido control de luciferasa “Renilla”, plásmido pRLTK y diferentes combinaciones de plásmidos de expresión, pHA-SHOX2, pHA-SOX5, pFLAG-SOX6 y pHA-SOX9. Los resultados demuestran que la combinación de SHOX2 con los diferentes cofactores, SOX5/SOX6, produce un aumento de la actividad de luciferasa. En cambio, SOX9, bien por sí solo, o en combinación con el trío SOX, reduce drásticamente los niveles de luciferasa. El incremento en los valores de luciferasa se obtuvo normalizando las unidades de luciferasa de cada una de las muestras, frente a las unidades de luciferasa de la muestra transfectada únicamente con el plásmido control. Los valores representan la media \pm DE de tres réplicas biológicas; cada réplica representa la media de tres ensayos de luciferasa por transfección. Los asteriscos muestran que los valores son estadísticamente significativos ($p^{**} < 0.001$).

8.2. Identificación de *ACAN* como diana transcripcional de SHOX2

8.2.1. SHOX2 coopera con el trío SOX en la activación del *enhancer* de *ACAN*

Para demostrar que SHOX2, al igual que SHOX, coopera con el trío SOX en la activación del *enhancer* de *ACAN*, se realizó un ensayo de luciferasa en células U2OS. Las células se cotransfectaron con diferentes combinaciones de SHOX, SHOX2 y los diferentes cofactores, SOX5/SOX6 y SOX9, introducidos en plásmidos de expresión y el promotor de *ACAN* en el plásmido reportero de la luciferasa, p89Luc-*ACAN*(4x Δ 1), que contiene cuatro copias en tándem del *enhancer* del gen.

Cuando sobreexpresamos SHOX2 en las células osteogénicas, el incremento en la actividad de luciferasa no es muy diferente al observado en las células que sobre-

expresan solamente ACAN, por lo que, aparentemente, SHOX2 no es capaz por sí solo de activar su *enhancer* (Fig.36). Sin embargo, estos resultados cambian en presencia de los cofactores, SOX5/SOX6 y SOX9. La combinación de SHOX2 con cualquiera de ellos provoca un incremento en la activación de ACAN de ~5 veces sobre la actividad de luciferasa generada cuando sobreexpresamos únicamente SHOX2 (Fig.36 y 37). El efecto combinado de SHOX2 junto con el trío SOX, aumenta ~3,5 veces la actividad de luciferasa en relación a los incrementos producidos solo por el trío cuando SHOX2 no esta expresado. Por tanto, los resultados sugieren, que SHOX2 coopera con el trío SOX en la activación del *enhancer* de ACAN.

Posteriormente, analizamos el efecto de dos mutaciones de SHOX2 p.L155V y SHOX2 p.Q234X, en combinación con el trío SOX sobre la expresión de ACAN. Ambas mutaciones, reducen la actividad de luciferasa unas ~2,5 veces con respecto a la activación observada en presencia de SHOX2 salvaje (Fig.36 y 37).

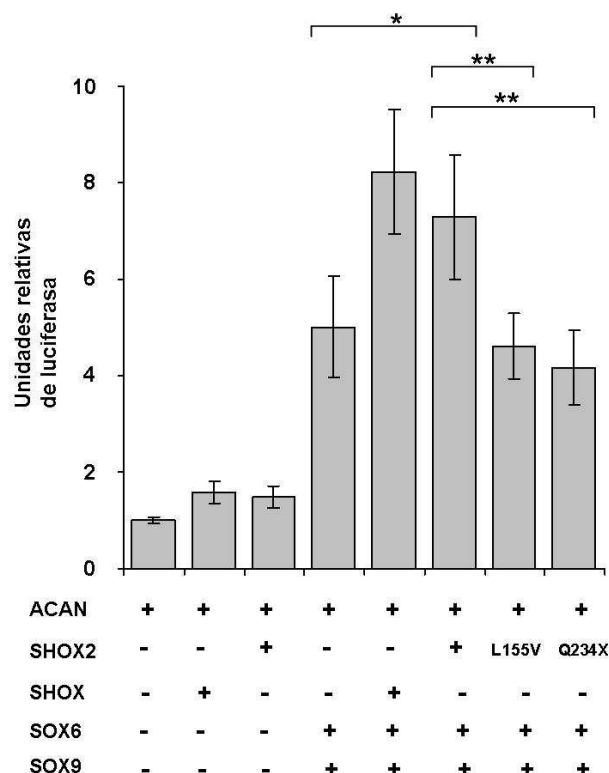


Figura 36. Estudio de la función de SHOX2 junto con SOX6 y SOX9 sobre la activación del *enhancer* de ACAN. Ensayo de luciferasa en células U2OS transfectadas con los plásmidos reporteros p89Luc-ACAN (4xA1), con el plásmido control de luciferasa “Renilla”, plásmido pRLTK y diferentes combinaciones de plásmidos de expresión, pHA-SHOX2, pFLAG-SOX6 y pHA-SOX9. Los resultados confirman que SHOX2 por sí solo, no es capaz de activar el *enhancer* de ACAN pero la combinación de SHOX2 con los cofactores SOX6 y SOX9 incrementa considerablemente los niveles de luciferasa. Los valores representan la media +/- DE de tres réplicas biológicas; cada réplica representa la media de tres ensayos de luciferasa por transfección. Los asteriscos muestran que los valores son estadísticamente significativos (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$).

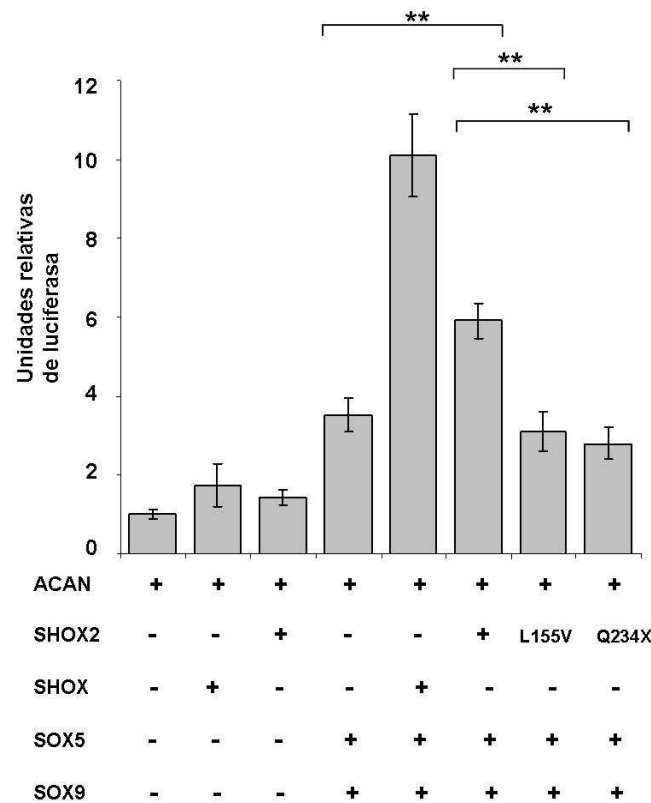


Figura 37. Estudio de la función de SHOX2 junto con SOX5 y SOX9 sobre la activación del *enhancer* de ACAN. Ensayo de luciferasa en células U2OS transfectadas con los plásmidos reporteros p89Luc-ACAN (4x A1), con el plásmido control de luciferasa “Renilla”, plásmido pRLTK y diferentes combinaciones de plásmidos de expresión, pHA-SHOX2, pHA-SOX5 y pHA-SOX9. Los resultados confirman que SHOX2 por sí solo, no es capaz de activar el *enhancer* de ACAN pero la combinación con los cofactores SOX5 y SOX9 incrementa considerablemente los niveles de luciferasa. El incremento en los valores de luciferasa se obtuvo normalizando las unidades de luciferasa de cada una de las muestras, frente a las unidades de luciferasa de la muestra transfectada únicamente con el plásmido control. Los valores representan la media \pm DE de tres réplicas biológicas; cada réplica representa la media de tres ensayos de luciferasa por transfección. Los asteriscos muestran que los valores son estadísticamente significativos (** $p < 0.001$).

8.3. Determinación de *Col2a1* como posible diana transcripcional de SHOX2

8.3.1. Función de SHOX2 y del SOX trío en la activación de *Col2a1*

Los estudios llevados a cabo por Lefebvre y col., 1998, determinaron que Sox9 en combinación con los cofactores L-Sox5/Sox6, se unía al *enhancer* de *Col2a1* y era capaz de activarlo, por ello, nos planteamos la posibilidad de estudiar el efecto de SHOX2 junto con el trío SOX en la activación de *Col2a1*. Para demostrar si SHOX2 en combinación con el trío SOX era capaz de unirse al *enhancer* de *Col2a1* y activarlo, se realizó un ensayo de luciferasa en células U2OS. Las células se cotransfectaron con SHOX2, SOX5, SOX6 y SOX9 introducidos en los plásmidos de expresión y la región reguladora de *Col2a1* en el plásmido reportero de la luciferasa, p89Luc-*Col2a1enhancer*.

Cuando sobreexpresamos SHOX2 en las células osteogénicas el incremento en la actividad de luciferasa no es muy diferente al observado en las células que sobreexpresan únicamente Col2a1, por lo que, aparentemente, SHOX2 no es capaz por sí solo de activar su *enhancer* (Fig.38). Los datos de la sobreexpresión de SHOX2 junto con los diferentes cofactores, SOX5, SOX6 y SOX9 no son muy claros. El patrón que sigue SHOX2 en todos los casos, tanto si sobre-expresamos SHOX2-SOX5, SHOX2-SOX6 ó SHOX2-SOX9, es producir una disminución de los niveles de luciferasa con respecto al valor obtenido cuando se sobreexpresan cada uno de ellos por separado. Lo mismo ocurre en la combinación de SHOX2 con el trío de SOX. Debido a que el descenso observado no se considera significativo, en este caso concluimos que SHOX2, ni de manera directa, ni en combinación con los cofactores, SOX5, SOX6 y SOX9 sería capaz de activar el *enhancer* de *Col2a1* (Fig.38).

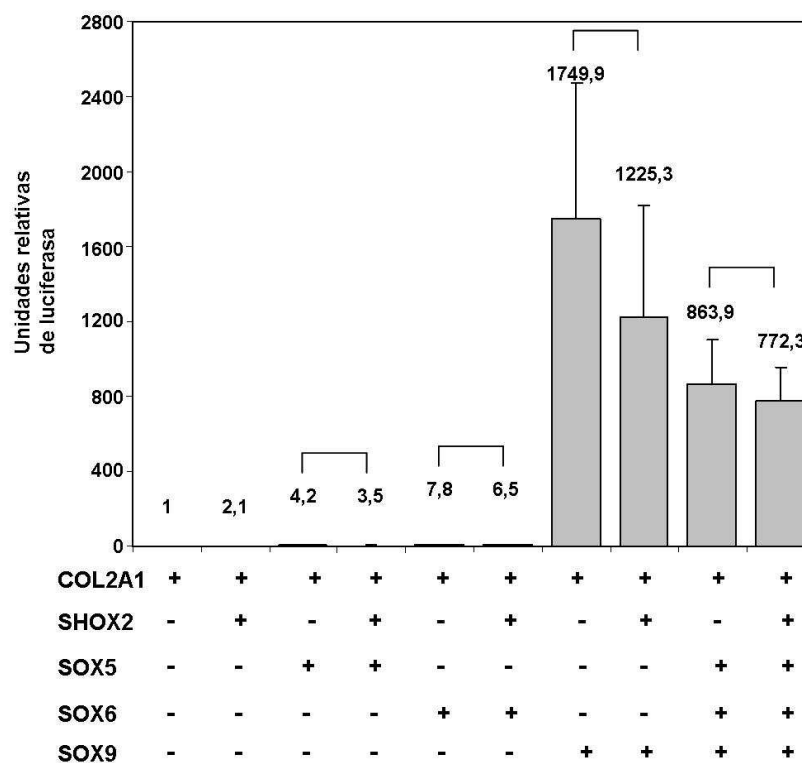


Figura 38. Estudio de la función de SHOX2 junto con el SOX trío sobre la activación del *enhancer* de *Col2a1*. Ensayo de luciferasa en células U2OS transfectadas con los plásmidos reporteros p89Luc-*Col2a1enhancer*, con el plásmido control de luciferasa “Renilla”, plásmido pRLTK, y diferentes combinaciones de plásmidos de expresión, pHA-SHOX2, pHA-SOX5, pFLAG-SOX6 y pHA-SOX9. Los resultados confirman que SHOX2 ni por sí solo ni cooperando con el SOX trío es capaz de activar el *enhancer* de *Col2a1*. El incremento en los valores de luciferasa se obtuvo normalizando las unidades de luciferasa de cada una de las muestras, frente a las unidades de luciferasa de la muestra transfectada únicamente con el plásmido control. Los valores representan la media \pm DE de tres réplicas biológicas; cada réplica representa la media de tres ensayos de luciferasa por transfección. Sobre cada columna aparece la media de los valores de luciferasa obtenidos para cada combinación.

CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DOS MUTACIONES DEL GEN *SHOX*

1. DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES p.A170P y p.A170D

En el análisis genético rutinario llevado a cabo en el laboratorio para la detección de mutaciones en el gen *SHOX* y en sus secuencias reguladoras en pacientes con DLW y DML, detectamos 12 casos que presentaban la mutación ya descrita c.508G>C, (p.A170P) en el exón 4 del gen *SHOX* y otros dos casos diferentes, que presentaban una nueva mutación c.509C>A, (p.A170D).

Debido a la alta incidencia de la mutación p.A170P y la presencia de otra mutación que afectaba al mismo aminoácido, realizamos estudios genéticos y funcionales de las dos mutaciones.

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTACIONES p.A170P y p.A170D

2.1. Caracterización clínica de los individuos que presenta la mutación p.A170P

La mutación p.A170P se identificó en doce familias con miembros afectados de DLW ó DML (Fig.39). Se estudiaron genéticamente un total de 39 pacientes, 34 con DLW y 4 con DML, que presentaban la mutación p.A170P en heterocigosis o en homocigosis, respectivamente. Además se realizó un estudio físico y radiológico de un feto con DML perteneciente a una de las familias estudiadas (Fam.11, IV-9) (Fig.40). Todas las familias estudiadas a excepción de una, son de etnia gitana. Los datos clínicos de los miembros afectados de las diferentes familias estudiadas se detallan en la tabla 5.

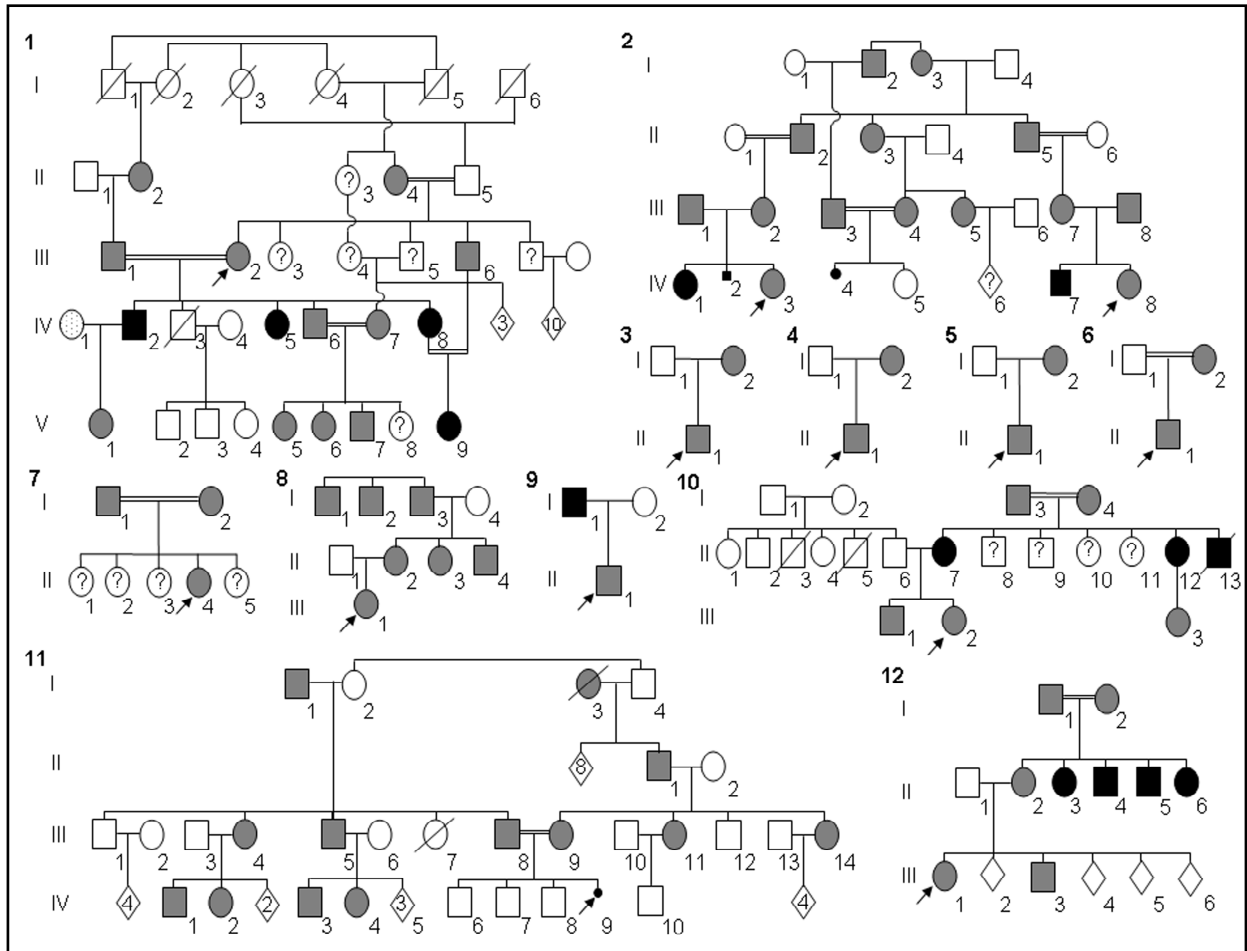


Figura 39. Genealogía de las familias con la mutación p.A170P de SHOX. Árbol genealógico de las doce familias estudiadas portadoras de la mutación p.A170P de SHOX. Los individuos que presentan DLW están representados con los símbolos en gris y los individuos afectados con DML aparecen en negro. El individuo IV.1 de la familia 1, fue clínica y genéticamente diagnosticado de acondroplasia (mutación c.1138G>A, p.G380R, de FGFR3). Los pacientes de los cuales se desconoce su diagnóstico, aparecen con símbolo de interrogación.

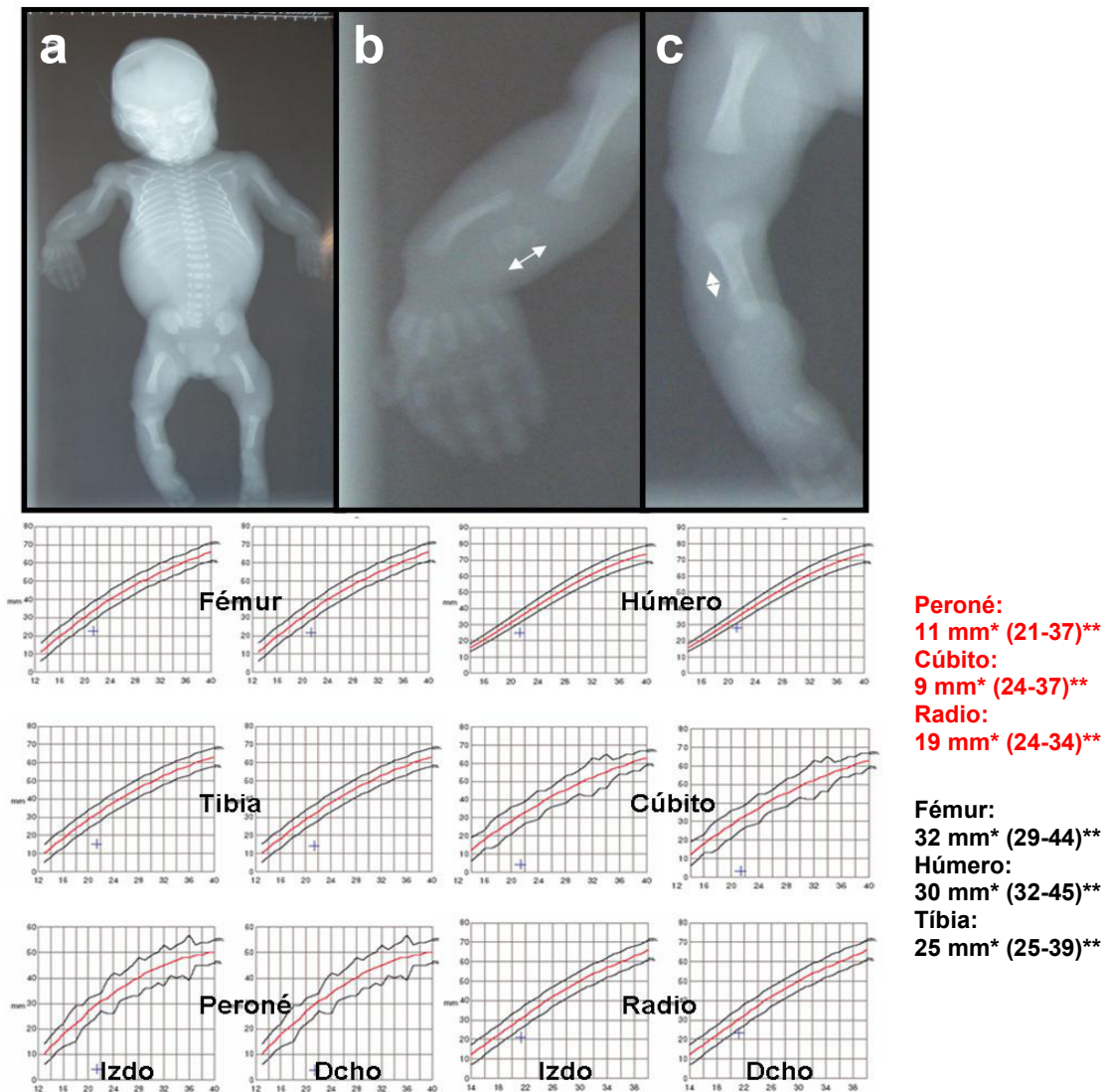


Figura 40. Estudio radiológico del feto con DML (Fam.11, IV-9). a. Serie ósea completa. b. Desviación cubital del radio y acortamiento del húmero. c. Mínima osificación del pie izquierdo. En la parte derecha se indican las medidas de los huesos del feto DML*. Anomalia fetal con acortamiento mesomélico y rizomélico de las extremidades. **Medidas de referencia de los huesos largos según la ECO (Jeanty R. Radiology 1983).

Tabla 5: Datos clínicos de las 12 familias que presentan DLW ó DML y portadores de la mutación p.A170P en heterocigosis o en homocigosis, respectivamente.

| Familia | Etnia | Paciente | Sexo (H/M) | Enfermedad | Detección de la mutación p.A170P | Edad (años) | Altura (cm) | Altura (DE) | Presencia de la deformidad de Madelung (DM) | Otros datos clínicos y auxológicos |
|---------|--------|----------|------------|------------|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|---|---|
| 1 | Gitana | II.4 | M | DLW | - | Adulto | 140.0 | -3.7 | DM | - |
| 1 | Gitana | III.2 | M | DLW | Sí | Adulto | 140.8 | -3.6 | DM | - |
| 1 | Gitana | III.6 | H | DLW | - | Adulto | 148.0 | -4.5 | DM | - |
| 1 | Gitana | IV.2 | H | DML | Sí | Adulto | SS | - | DM | - |
| 1 | Gitana | IV.5 | M | DML | - | Adulto | 109.0 | -9.1 | - | - |
| 1 | Gitana | IV.6 | H | DLW | Sí | Adulto | TB | - | DM | - |
| 1 | Gitana | IV.7 | M | DLW | Sí | Adulto | TB | - | DM | - |
| 1 | Gitana | IV.8 | M | DLW | - | Adulto | 110.0 | -9.0 | - | - |
| 1 | Gitana | V.1 | M | DLW | Sí | Adulto | TB | - | DM | - |
| 1 | Gitana | V.5 | M | DLW | Sí | Adulto | TB | - | DM | - |
| 1 | Gitana | V.6 | M | DLW | Sí | Adulto | TB | - | DM | - |
| 1 | Gitana | V.7 | H | DLW | Sí | 12.0 | 116.6 | -5.1 | DM | - |
| 1 | Gitana | V.9 | M | DML | - | 7.0 | 89.0 | -8.0 | - | - |
| 2 | Gitana | III.1 | H | DLW | Sí | Adulto | TB | - | DM | - |
| 2 | Gitana | III.2 | M | DLW | - | Adulto | TB | - | DM | - |
| 2 | Gitana | III.3 | H | DLW | Sí | Adulto | TB | - | DM | - |
| 2 | Gitana | III.4 | M | DLW | Sí | Adulto | TB | - | DM | - |
| 2 | Gitana | III.5 | M | DLW | Sí | Adulto | TB | - | DM | - |
| 2 | Gitana | III.7 | M | DLW | Sí | Adulto | TB | - | DM | - |
| 2 | Gitana | III.8 | H | DLW | Sí | Adulto | TB | - | DM | - |
| 2 | Gitana | IV.1 | M | DML | - | Feto | TB | - | - | - |
| 2 | Gitana | IV.2 | H | DML | - | Feto | ND | ND | ND | Aborto a las 16 semanas de gestación debido a un acortamiento severo de las extremidades observado mediante ultrasonografía. No se realizó estudio genético |
| 2* | Gitana | IV.3 | M | DLW | Sí | Feto | ND | ND | ND | Diagnóstico prenatal a las 19 semanas de gestación |
| 2* | Gitana | IV.4 | M | DML | Sí | Feto | ND | ND | ND | Aborto a las 18 semanas de gestación después del diagnóstico prenatal |

| Familia | Etnia | Paciente | Sexo (H/M) | Enfermedad | Detección de la mutación p.A170P | Edad (años) | Altura (cm) | Altura (DE) | Presencia de la deformidad de Madelung (DM) | Otros datos clínicos y auxológicos |
|---------|----------|----------|------------|------------|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|---|--|
| 2 | Gitana | IV.5 | M | N | No | Feto | ND | ND | ND | Diagnóstico prenatal a las 16 semanas de gestación Diagnóstico prenatal no realizado por riesgo a padecer DLW pero no DML |
| 2 | Gitana | IV.6 | ND | ND | No | Feto | ND | ND | ND | |
| 2 | Gitana | IV.7 | H | DML | - | (Niño) | TB | - | - | |
| 2* | Gitana | IV.8 | M | DLW | Sí | Feto | ND | ND | ND | Diagnóstico prenatal a las 19 semanas de gestación |
| 3 | Gitana | I.2 | M | DLW | Sí | Adulto | TB | - | DM | - |
| 4 | Española | I.2 | M | DLW | Sí | Adulto | 142.5 | -3.3 | DM | - |
| 4 | Española | II.1 | H | DLW | Sí | 3.5 | 88.5 | -2.7 | DM | - |
| 5 | Gitana | I.2 | M | DLW | Sí | Adulto | 143.0 | -3.2 | DM | - |
| 5 | Gitana | II.1 | H | DLW | Sí | 14.4 | 145.0 | -2.4 | DM | - |
| 6 | Gitana | I.2 | M | DLW | Sí | Adulto | 146.1 | -2.6 | DM | Escoliosis cervical |
| 6 | Gitana | II.1 | H | DLW | Sí | 13.4 | 134.1 | -2.8 | DM | Escoliosis cervical |
| 7 | Gitana | II.4 | M | DLW | Sí | 11.8 | 113.0 | -5.6 | DM | Escoliosis cervical |
| 8 | Gitana | II.2 | M | DLW | Sí | Adulto | 135.0 | -4.6 | DM | - |
| 8 | Gitana | III.1 | M | DLW | Sí | 6.5 | 99.5 | -3.7 | DM | - |
| 9 | Gitana | I.1 | H | DML | - | Adulto | 120 | -8.2 | DM | - |
| 9 | Gitana | II.1 | M | DLW | Sí | Niño | TB | - | DM | - |
| 10 | Gitana | II.7 | M | DML | Sí | Adulto | 101.0 | -10.2 | DM | - |
| 10 | Gitana | III.1 | M | DLW | Sí | 8.5 | TB | - | DM | - |
| 11 | Gitana | I.1 | H | DLW | - | Adulto | TB | - | DM | - |
| 11 | Gitana | I.3 | M | DLW | - | Adulto | TB | - | DM | - |
| 11 | Gitana | I.9 | H | DLW | - | Adulto | 143.0 | -3.7 | DM | - |
| 11 | Gitana | III.4 | M | DLW | - | Adulto | 145.0 | -3.3 | DM | - |
| 11 | Gitana | III.5 | H | DLW | - | Adulto | 155.0 | -3.6 | DM | - |
| 11 | Gitana | III.8 | H | DLW | Sí | Adulto | 152.0 | -4.1 | DM | - |
| 11 | Gitana | III.9 | M | DLW | Sí | Adulto | 144.0 | -3.5 | DM | - |
| 11 | Gitana | III.11 | M | DLW | - | Adulto | 140.0 | -4.2 | DM | - |
| 11 | Gitana | III.14 | M | DLW | - | Adulto | 147.0 | -3.0 | DM | - |

| Familia | Etnia | Paciente | Sexo (H/M) | Enfermedad | Detección de la mutación p.A170P | Edad (años) | Altura (cm) | Altura (DE) | Presencia de la deformidad de Madelung (DM) | Otros datos clínicos y auxológicos |
|---------|--------|----------|------------|------------|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|---|--|
| 11 | Gitana | IV.1 | H | DLW | - | ND | TB | - | DM | - |
| 11 | Gitana | IV.2 | M | DLW | - | ND | TB | - | DM | - |
| 11 | Gitana | IV.3 | H | DLW | - | ND | TB | - | DM | - |
| 11 | Gitana | IV.4 | M | DLW | - | ND | TB | - | DM | - |
| 11** | Gitana | IV.9 | H | DML | Sí | Feto | TB | * | DM | **Aborto a las 22 semanas de gestación. Datos de la necropsia: Longitud del cuerpo 25cm, Displasia Mesomélica. Longitud de las extremidades: humero 3cm, radio 1.9cm, cubito 0.9cm, femur 3.2cm, tibia 2.5cm, peroné 1.1cm |
| 12 | Gitana | II.2 | M | DLW | Sí | Adulto | 142.0 | -3.4 | DM | - |
| 12 | Gitana | III.1 | M | DLW | Sí | 9.6 | 127.0 | -1.7 | DM | - |

DLW: Discondrosteosis de Léri-Weill; DML: Displasia mesomélica de Langer; TB: Talla baja; DE: Desviación estándar de la altura por edad, sexo y población; ND: no hay datos, N: normal; M: mujer; H: hombre.

*- Análisis prenatal realizado en el ADN extraído del líquido amniótico.

** - Análisis realizado en el ADN extraído de tejido procedente de un aborto.

2.2. Caracterización clínica de los individuos que presentan la mutación p.A170D

La mutación c.509G>A, (p.A170D) de SHOX fue identificada en dos familias españolas con miembros que presentaban DLW (Fig.41). Las características clínicas de los individuos estudiados se detallan en la tabla 6.

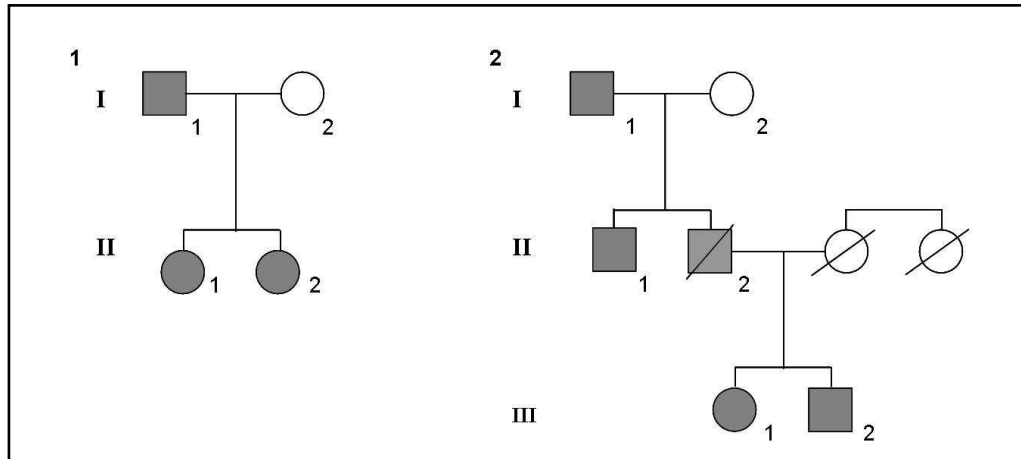


Figura 41. Genealogía de las familias con la mutación p.A170D de SHOX. Árbol genealógico de las dos familias estudiadas portadoras de la mutación p.A170D de SHOX. Los individuos que presentan DLW se representan con los símbolos en gris.

Tabla 6: Datos clínicos de las dos familias que presentan DLW y portadores de la mutación p.A170D de SHOX.

| Familia | Etnia | Paciente | Sexo (H/M) | Enfermedad | Detección de la mutación p.A170D | Altura (cm) | Altura (DE) | Presencia de la deformidad de Madelung (DM) |
|---------|----------|----------|------------|------------|----------------------------------|-------------|-------------|---|
| 1 | Española | I.1 | H | DLW | Sí | - | - | DN |
| 1 | Española | II.1 | M | DLW | Sí | - | - | ND |
| 1 | Española | II.2 | M | DLW | Sí | - | - | ND |
| 2 | Española | I.1 | H | DLW | ND | 143 | -3.2 | NE |
| 2 | Española | II.1 | H | DLW | ND | 143 | -3.2 | NE |
| 2 | Española | II.2 | H | DLW | ND | 153 | -3.26 | NE |
| 2 | Española | III.1 | M | DLW | Sí | 120 | -2.6 | DM |
| 2 | Española | III.2 | H | DLW | Sí | ND | ND | DM |

DLW: Discondrosteosis de Léri-Weill; M: mujer; H: hombre; ND: no hay datos; DE: desviaciones estándar por edad, sexo y población; NE: no examinado

2.3. Análisis del haplotipo de las doce familias estudiadas con la mutación p.A170P

Se realizó el estudio del haplotipo asociado a la mutación p.A170P para determinar la posible existencia de un ancestro común en las doce familias estudiadas.

Seleccionamos ocho marcadores microsatélites localizados tanto intragénicamente como en las regiones flanqueantes 5' y 3' del gen *SHOX* (Fig.42).

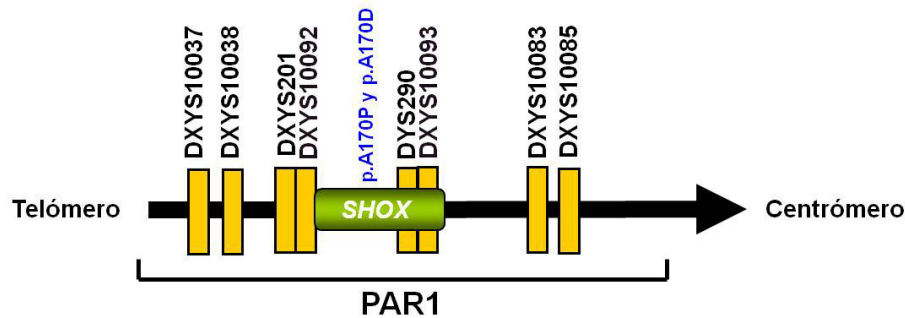


Figura 42. Localización de los marcadores microsatélites empleados para el estudio del haplotipo asociado a la mutación p.A170P. Los marcadores microsatélites se encuentran localizados tanto intragénicamente como en las regiones flanqueantes del gen *SHOX*. El bloque del haplotipo estudiado se extiende desde los marcadores DXYS10038 hasta el DXYS10093. Las mutaciones p.A170P y p.A170D están localizadas en el exón 4 de *SHOX* entre los marcadores DXYS10092 y DYS290.

Los resultados revelan la presencia de un haplotipo común presente en todos los miembros de las familias afectadas con DLW y DML, apareciendo en una o dos copias respectivamente (tabla 7). El bloque del haplotipo tiene una extensión aproximada entre 77 kb y 165 kb, desde los marcadores microsatélites DXYS10038 a DXYS10093, incluyendo entre ellos la mutación p.A170P (tabla 7). La presencia de otros haplotipos alejados del gen *SHOX*, sugieren la existencia de diversos procesos de recombinación. Por ejemplo, uno de ellos se puede observar aguas abajo del gen *SHOX*, entre los marcadores DXYS10083 y DXYS10085.

Para determinar la probabilidad de que este haplotipo aparezca en la población gitana, se realizó un estudio en dos poblaciones controles mediante el uso de marcadores microsatélites: una cohorte de gitanos españoles no afectados (88 individuos= 176 cromosomas) y una cohorte de individuos españoles con estatura normal (173 individuos= 346 cromosomas). La probabilidad de observar este haplotipo es de 1/40062 en los gitanos españoles y de 1/390000 en los controles españoles con estatura normal.

Tabla 7. Estudio del haplotipo de las doce familias con DLW/DML portadoras de la mutación p.A170P determinado mediante el uso de marcadores microsatélites flanqueantes o intragénicos del gen *SHOX*. La mutación p.A170P está localizada entre los marcadores DXYS10092 y DYS290. El haplotipo común que cosegrega con la mutación y el fenotipo, está indicado en negrita.

| Familia | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 |
|------------------|-----------------|-----------------|---------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Miembro | III.2 | III.6 | IV.1 | IV.2 | IV.6 | IV.7 | V.1 | V.5 | V.6 | V.7 | III.1 | III.2 | III.3 |
| Patología | DLW | DLW | ACH | DML | DLW | DLW | DLW | DLW | DLW | DLW | DLW | DLW | DLW |
| DXYS10037 | 180-180 | 180-180 | 200-180 | 180-180 | 180-180 | 200-180 | 180-180 | 180-180 | 180-200 | 180-180 | 180-198 | 180-200 | 200-180 |
| DXYS10038 | 217- 217 | 217- 217 | 209-213 | 217-217 | 217- 217 | 217- 217 | 213- 217 | 217- 217 | 217 -217 | 217- 217 | 217 -217 | 217 -213 | 209- 217 |
| DXYS201 | 135- 155 | 135- 155 | 145-155 | 155-155 | 135- 155 | 157- 155 | 155- 155 | 135- 155 | 155 -157 | 135- 155 | 155 -135 | 155 -147 | 141- 155 |
| DXYS10092 | 357- 359 | 357- 359 | 363-363 | 359-359 | 357- 359 | 347- 359 | 363- 359 | 357- 359 | 359 -347 | 357- 359 | 359 -345 | 359 -361 | 341- 359 |
| DYS290 | 292- 292 | 292- 292 | 306-296 | 292-292 | 292- 292 | 296- 292 | 296- 292 | 292- 292 | 292 -296 | 292- 292 | 292 -292 | 292 -292 | 294- 292 |
| DXYS10093 | 249- 235 | 247- 235 | 253-247 | 235-235 | 247- 235 | 235- 235 | 247- 235 | 247- 235 | 235 -235 | 247- 235 | 235 -251 | 235 -245 | 251- 235 |
| DXYS10083 | 156-160 | 156-160 | 170-160 | 160-160 | 156-160 | 154-160 | 160-160 | 156-160 | 160-154 | 156-160 | 160-172 | 160-154 | 160-162 |
| DXYS10085 | 218-224 | 218-224 | 226-210 | 224-224 | 218-224 | 222-224 | 210-224 | 218-224 | 224-222 | 218-224 | 216-224 | 216-220 | 216-222 |

| Familia | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 |
|------------------|-----------------|-----------------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Miembro | III.4 | III.5 | III.6 | III.7 | III.8 | IV.3 | IV.4 | IV.5 | IV.8 | I.2 | II.1 | I.2 | II.1 |
| Patología | DLW | DLW | N | DLW | DLW | DLW | DML | N | DLW | DLW | DLW | DLW | DLW |
| DXYS10037 | 200-180 | 200-180 | 196-200 | 200-180 | 180-200 | 198-180 | 180-180 | 200-200 | 180-200 | 200-180 | 202-180 | 202-180 | 202-180 |
| DXYS10038 | 209- 217 | 209- 217 | 197-197 | 217 -197 | 209- 217 | 217- 217 | 217 - 217 | 209-209 | 197- 217 | 209- 217 | 213- 217 | 209- 217 | 209- 217 |
| DXYS201 | 143- 155 | 143- 155 | 149-155 | 155 -151 | 159- 155 | 135- 155 | 155 - 155 | 151-143 | 151- 155 | 143- 155 | 151- 155 | 143- 155 | 143- 155 |
| DXYS10092 | 341- 359 | 341- 359 | 347-355 | 359 -343 | 349- 359 | 345- 359 | 359 - 359 | 341-341 | 343- 359 | 359- 359 | 343- 359 | 347- 359 | 347- 359 |
| DYS290 | 306- 292 | 306- 292 | 296-306 | 292 -306 | 292- 292 | 292- 292 | 292 - 292 | 294-306 | 306- 292 | 296- 292 | 296- 292 | 296- 292 | 296- 292 |
| DXYS10093 | 245- 235 | 245- 235 | 235-255 | 235 -245 | 249- 235 | 251- 235 | 235 - 235 | 251-245 | 245- 235 | 243- 235 | 235- 235 | 261- 235 | 261- 235 |
| DXYS10083 | 160-160 | 160-160 | 160-162 | 160-160 | 170-160 | 172-160 | 162-160 | 162-160 | 160-160 | 158-160 | 154-160 | 158-160 | 154-160 |
| DXYS10085 | 214-216 | 214-216 | 220-222 | 216-214 | 216-212 | 224-216 | 222-216 | 222-214 | 214-212 | 218-214 | 224-214 | 218-214 | 224-214 |

| Familia | 5 | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 | 7 | 8 | 8 | 8 | 9 | 10 | 10 |
|------------------|---------|-----------------|-----------------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|---------|-------------------------|
| Miembro | I.1 | I.2 | II.1 | I.1 | I.2 | II.1 | II.4 | II.1 | II.2 | III.1 | II.1 | II.6 | II.7 |
| Patología | N | DLW | DLW | N | DLW | DLW | DLW | N | DLW | DLW | DLW | N | DML |
| DXYS10037 | 200-192 | 200-180 | 192-180 | 194-200 | 198-180 | 200-180 | 180-180 | 198-200 | 180-190 | 200-180 | 180-198 | 198-192 | 180-180 |
| DXYS10038 | 209-213 | 209- 217 | 213- 217 | 209-209 | 199- 217 | 209- 217 | 217- 217 | 213-217 | 217 -217 | 217- 217 | 213- 217 | 197-217 | 217 - 217 |
| DXYS201 | 143-149 | 143- 155 | 149- 155 | 143-159 | 149- 155 | 159- 155 | 143- 155 | 145-151 | 155 -145 | 151- 155 | 147- 155 | 135-145 | 155 - 155 |
| DXYS10092 | 355-343 | 355- 359 | 343- 359 | 347-349 | 349- 359 | 349- 359 | 339- 359 | 361-353 | 359 -361 | 353- 359 | 361- 359 | 317-361 | 359 - 359 |
| DYS290 | 296-296 | 296- 292 | 296- 292 | 292-296 | 296- 292 | 296- 292 | 296- 292 | 296-292 | 292 -306 | 292- 292 | 292- 292 | 292-306 | 292 - 292 |
| DXYS10093 | 235-235 | 235- 235 | 235- 235 | 233-233 | 247- 235 | 233- 235 | 253- 235 | 235-231 | 235 -257 | 231- 235 | 245- 235 | 235-257 | 235 - 235 |
| DXYS10083 | 162-154 | 154-160 | 154-160 | 154-154 | 156-160 | 154-160 | 162-160 | 156-158 | 162-160 | 158-160 | 164-160 | 160-162 | 160-160 |
| DXYS10085 | 216-224 | 216-214 | 224-214 | 220-224 | 222-214 | 224-214 | 216-214 | 224-228 | 216-212 | 228-216 | 224-216 | 222-212 | 224-224 |

DLW: Discondrosteosis de Léri-Weill; DML: Displasia mesomélica de Langer; ACH: Acondroplasia; N: normal

Debido a que la mutación p.A170P fue identificada en 11 familias españolas de etnia gitana, intentamos determinar su origen a través de la genealogía de cada uno de los miembros de las familias estudiadas. Los datos obtenidos en uno de los pacientes (Familia 10), homocigoto para la mutación, fueron interesantes, puesto que su familia había migrado a España procedente de Europa del Este hace algunas generaciones. Debido a la procedencia de este paciente quisimos confirmar si la mutación era de origen exclusivamente español y para ello, se estableció una colaboración con la Dra. Luba Kalaydjieva (Laboratory of Molecular Genetics, Western Australian Institute for Medical Research), para analizar la presencia de la mutación p.A170P en una cohorte de 359 individuos de etnia gitana procedentes de Bulgaria mediante HRM (tabla 8). Además se buscó el haplotipo asociado con la mutación p.A170P en 25 tríos (padres-hijos), que corresponden a un total de 50 adultos (=100 cromosomas analizados), procedentes de individuos con diferentes patologías y representativos de un grupo de gitanos búlgaros. En ninguno de los estudios, se detectó la mutación p.A170P ni la presencia del haplotipo identificado (Anexo 1).

Tabla 8. Detalles de los grupos gitanos búlgaros estudiados y su procedencia étnica.

| Denominación de los grupos de gitanos búlgaros | Migraciones | Número de individuos |
|---|--|-----------------------------|
| Blacksmith | Desde los Balcanes | 53 |
| Darakchii | Desde los Balcanes | 47 |
| Kalaydjii North | Colonización temprana a Bulgaria | 81 |
| Kalaydjii South | Desde Rumania/Moldavia a Bulgaria en el s.XVII y XVIII | 6 |
| Kalderash | Desde Rumania/Moldavia a Bulgaria en el s.XIX | 9 |
| Lom | Desde Rumania/Moldavia a Bulgaria en el s.XVII y XVIII | 72 |
| Musicians | Desde los Balcanes | 52 |
| Rudari | Desde Rumania | 39 |
| Total | | 359 |

2.4. Análisis del haplotipo de las familias estudiadas para la mutación p.A170D

En el estudio del haplotipo de las dos familias españolas que presentan la mutación p.A170D, no hemos observado un haplotipo común entre ellos, excluyendo así, la existencia de un ancestro común para esta mutación (tabla 9).

Tabla 9. Estudio del haplotipo de las dos familias con DLW y portadores de la mutación p.A170D. La mutación p.A170D está localizada entre los marcadores DXYS10092 y DYS290. No existe un haplotipo común para esta mutación.

| Familia | 1 | 1 | 1 | 2 |
|------------------|---------|---------|---------|---------|
| Miembro | I.1 | II.1 | II.2 | III-1 |
| Patología | DLW | DLW | DLW | DLW |
| DXYS10038 | 209-197 | 197-209 | 209-197 | 209-209 |
| DXYS201 | 143-151 | 135-143 | 143-151 | 151-143 |
| DXYS10092 | 359-337 | 312-359 | 359-337 | 317-361 |
| DYS290 | 296-292 | 306-296 | 296-292 | 272-292 |
| DXYS10093 | 251-233 | 253-251 | 251-233 | 253-255 |
| DXYS10083 | 222-220 | 216-222 | 222-220 | 208-222 |

DLW; Discondrosteosis de Léri-Weill

3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS MUTANTES DE SHOX, p.A170P Y p.A170D

Para determinar si la nueva mutación p.A170D también afecta a la localización nuclear de SHOX, introdujimos ambas mutaciones, la ya descrita p.A170P y la p.A170D en la secuencia ADNc de pEGFPC1-*SHOX* salvaje mediante mutagénesis dirigida. Cada una de las construcciones, se transfectaron en células de osteosarcoma humano U2OS, para comprobar la localización subcelular de las dos proteínas mutantes de SHOX mediante inmunocitoquímica (Fig.43). Los resultados demuestran que la proteína SHOX salvaje se encuentra localizaba exclusivamente en el núcleo, mientras las proteínas mutantes, p.A170P y p.A170D estaban mayoritariamente localizadas en el citoplasma de la célula.

Para confirmar el cambio en la localización de las dos proteínas mutantes, realizamos un Western Blot con los lisados nucleares y citoplásmicos de dichas proteínas. Los resultados demuestran que la proteína SHOX salvaje está localizada en el núcleo (Fig.44), mientras que las proteínas mutantes, p.A170P y p.A170D, aparecen tanto en el núcleo como en el citoplasma (Fig.44), confirmando que la presencia de mutaciones en los aminoácidos que forman parte de la señal de localización nuclear, alteran la capacidad de translocación de la proteína SHOX.

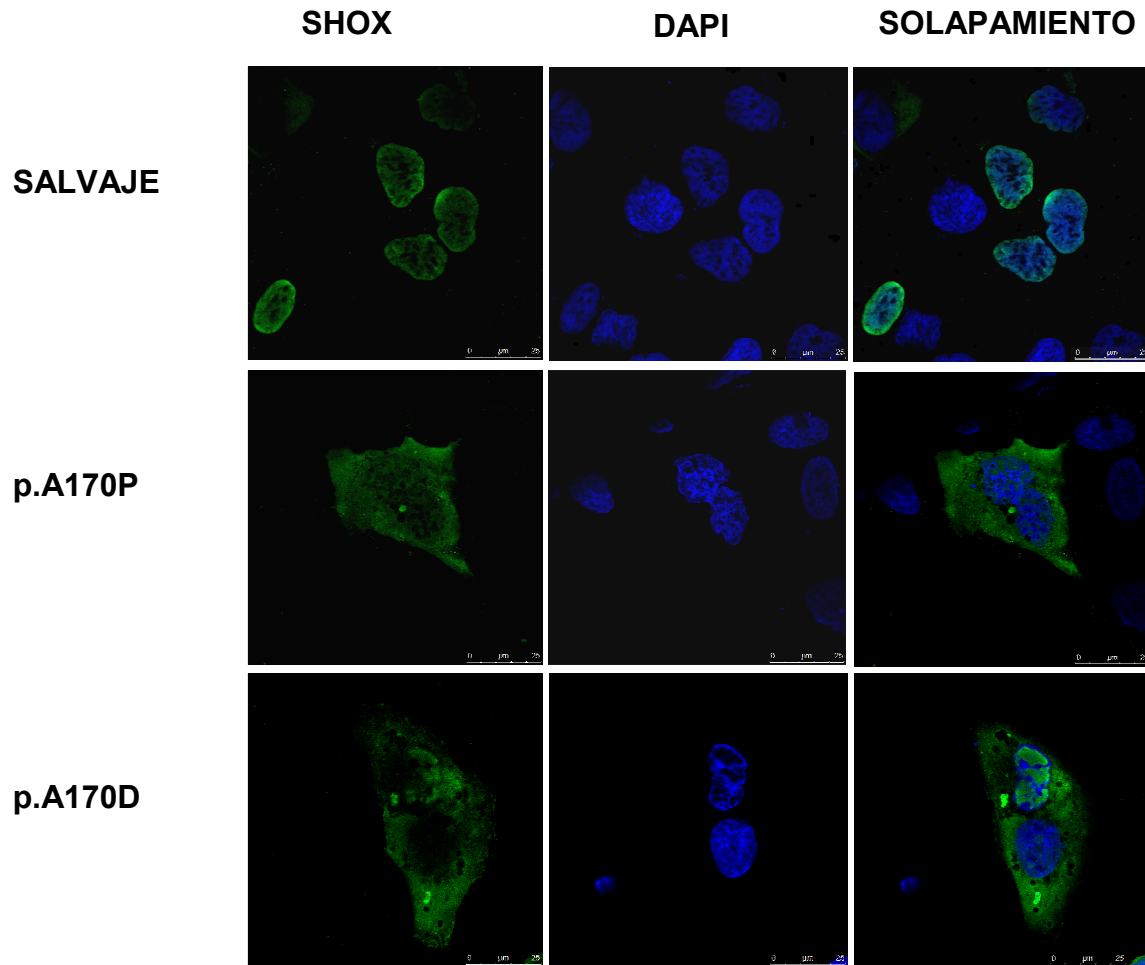


Figura 43. Estudio de localización subcelular de la proteína salvaje y las mutantes de SHOX p.A170P y p.A170D. Las células U2OS fueron transfectadas con SHOX salvaje y las mutantes, p.A170P y p.A170D. La expresión de SHOX se detectó usando anticuerpo policlonal anti-SHOX, generado en conejo, y el núcleo fue teñido con DAPI. Se puede observar como la proteína SHOX (imagen superior) está localizada en el núcleo, mientras que las dos proteínas mutantes (p.A170P y p.A170D), están localizadas mayoritariamente en el citoplasma de la célula, impidiendo su correcta localización celular. Las imágenes fueron obtenidas mediante un microscopio confocal a 20 aumentos.

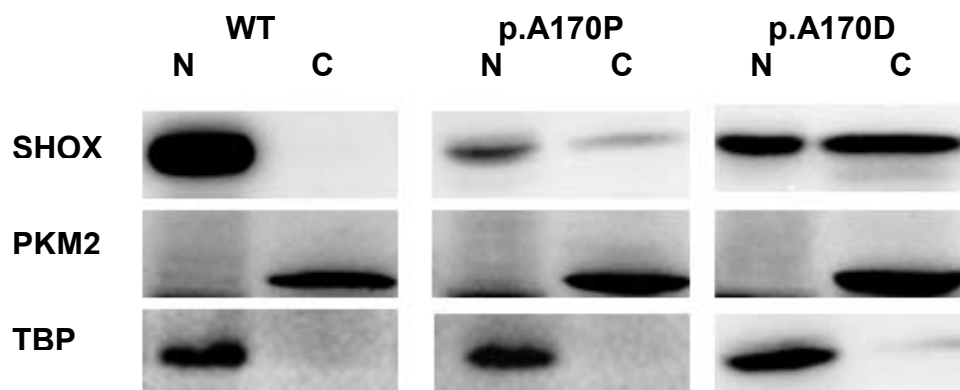


Figura 44. Resultado del Western Blot usando extractos de núcleo y citoplasma de células U2OS transfectadas con las construcciones de SHOX mutante y salvaje. N; lisados nucleares, C; lisados de citoplasma. PKM2 (Piruvate Kinase isozyme M2); anticuerpo empleado para detectar niveles endógenos de la proteína PKM2, localizada en el citoplasma de la célula (60 kDa); TBP (TATA-binding protein); anticuerpo empleado para detectar niveles endógenos de la proteína TBP localizada en el núcleo (37 kDa). La proteína SHOX salvaje (33 kDa) fue observada únicamente en el núcleo, mientras que las proteínas mutantes fueron detectadas tanto en citoplasma como en núcleo.

4. INMUNOHISTOQUÍMICA

Se estudió la expresión de SHOX mediante inmunohistoquímica en la placa de crecimiento de dos abortos espontáneos de fetos humanos, uno normal de 23 semanas de gestación y otro afectado con DML de 22 semanas de gestación (familia 11, IV.9), en el que se había previamente confirmado que presentaba dos copias de la mutación p.A170P. La expresión de SHOX y de la proteína SHOX mutante, aparece con la misma intensidad en condrocitos de reserva, proliferativos e hipertróficos en el feto normal y en el feto con DML (Fig.45).

En cuanto a su morfología, los condrocitos de la zona de reserva del feto con DML tienen un tamaño mayor, son más redondeados y tienden a agruparse en parejas con respecto a los del feto normal. Además, observamos que las columnas de condrocitos muestran un cierto grado de desorganización, en comparación con el feto normal. No aparecen diferencias morfológicas significativas en los condrocitos hipertróficos de ambas placas (Fig.45).

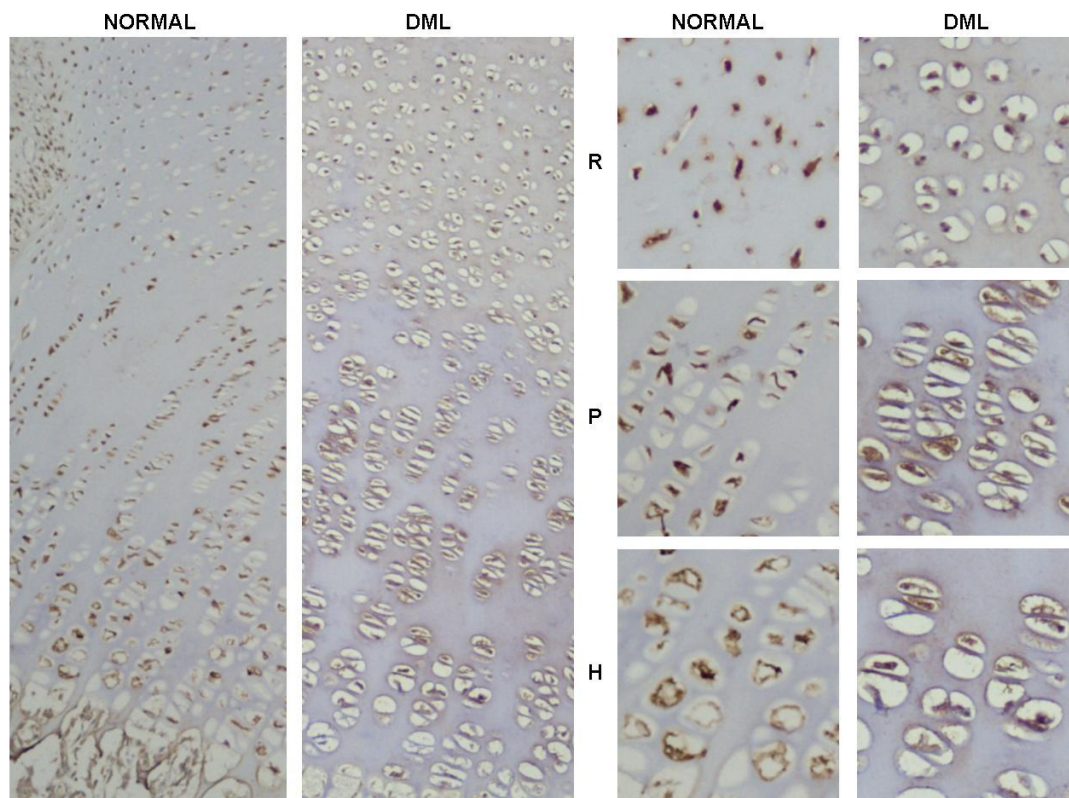


Figura 45. Comparación de la expresión de SHOX y de la proteína SHOX mutante en la placa de crecimiento humano. La inmunohistoquímica realizada en la placa de crecimiento (cúbito y radio) de un feto de 22 semanas de gestación con DML homocigoto para la mutación p.A170P y otro control normal de 23 semanas de gestación. Se observa expresión de SHOX y de la proteína mutante en todos los condrocitos de la zona de reserva (R), proliferativa (P) e hipertrófica (H) de ambas placas de crecimiento. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-SHOX y reveladas con DAB (20X).

DISCUSIÓN

CAPITULO 1

1. Caracterización de las dimerizaciones entre las diferentes isoformas de SHOX2 y SHOX: importancia de la función fisiológica de las dimerizaciones

Una de las características de las proteínas homeodominio de la clase “*paired*” es la capacidad de dimerización. Esta dimerización aumenta tanto la especificidad de unión al ADN como la eficiencia en la activación de la transcripción de otras proteínas (Wilson et al., 1993). SHOX2 es uno de los miembros que pertenecen a esta familia de proteínas, y mediante el sistema del doble híbrido de levaduras, hemos podido observar que las dos isoformas de SHOX2, SHOX2a y SHOX2b, son capaces de homo- y heterodimerizar *in vivo*. La homodimerización entre ambas proteínas se produce a través del homeodominio (HD) y del dominio de transactivación (OAR). Las mutaciones situadas en el homeodominio de la proteína (p.L155V y p.A173P) y la mutación p.R319P, localizada en el OAR, disminuyen la capacidad de dimerización, confirmando que ambos dominios están implicados en dicha interacción. Curiosamente, la mutación p.R196C, localizada también en el HD de SHOX2, no reduce su capacidad de interacción. Estos hechos nos llevan a pensar que, por una parte, las mutaciones que afectan a los aminoácidos L155 y A173, localizadas en la hélice III del HD, implican a ésta hélice en la interacción con el resto de las proteínas y pueden alterar la estructura tridimensional de la proteína SHOX2, afectando así su capacidad de dimerización. Y por otra, que la mutación que afecta al aminoácido R196 y que está localizada en la hélice II del HD, excluye a esta hélice de la interacción con el resto de las proteínas.

El descubrimiento de la interacción entre SHOX2 y SHOX nos llevó a caracterizar el dominio de SHOX2 involucrado en la misma. Los experimentos con clones parciales de SHOX2 descartaron que la región N-terminal de SHOX2 estuviera implicada en esta dimerización y sugirieron que la interacción se produce a través del HD y de la región C-terminal que incluye el OAR.

La existencia de los heterodímeros SHOX-SHOX2 podría suponer una nueva forma de regulación de las dianas transcripcionales de ambos genes ya que el hecho de poseer el mismo homeodominio (Blaschke et al., 1998) les permite unirse a las mismas regiones del ADN de sus genes diana, a través de la hélice III de éste dominio (Gehring et al., 1994). Es posible por lo tanto que, en aquellas células donde se expresen SHOX2 y SHOX, la formación de heterodímeros de ambos factores de transcripción y su unión a regiones reguladoras de genes diana pueda jugar un papel regulador de la transcripción de los mismos.

2. Identificación de SOX5 y SOX6, miembros junto con SOX9 del trío de SOX, como proteínas que interactúan con SHOX2

Previamente a este trabajo, identificamos a SOX5/SOX6 como los primeros cofactores que interactúan con SHOX (Aza-Carmona et al., 2011). Este hallazgo es relevante ya que estas interacciones permiten la formación de los primeros complejos multiproteicos en los que SHOX interviene para la activación de genes específicos del cartílago (Aza-Carmona et al., 2011). Debido a la alta homología que existe entre SHOX y SHOX2, nuestra hipótesis se centró en que SHOX2 podría compartir con SHOX la capacidad de unirse a los mismos factores de transcripción. Los factores de transcripción SOX5 y SOX6 son esenciales en la matriz extracelular del cartílago y desempeñan funciones importantes durante la condrogénesis por su cooperación con SOX9, y la formación del trío de SOX (Lefebvre et al., 2002). SOX5 y SOX6 carecen de un dominio de transactivación, por lo que su papel en la transcripción es principalmente estructural. Es decir, cooperan con otros factores de transcripción que sí poseen un dominio de transactivación, por ejemplo vía su interacción con SOX9, formando complejos multiproteicos que son capaces de activar a sus genes diana.

Por primera vez, hemos identificado y caracterizado la interacción existente entre SHOX2 con SOX5 y SOX6 mediante el sistema *in vivo* del doble híbrido de levaduras y su confirmación mediante ensayos de coimmunoprecipitación en células humanas. La caracterización de los dominios de SHOX2 implicados mediante clones parciales de los diferentes dominios de la proteína SHOX2 y el uso de mutaciones puntuales localizadas a lo largo de los diferentes dominios de SHOX2, demostraron que el HD de SHOX2 y el HMG de SOX6, son los dominios que participan en la interacción entre ambas proteínas. Se ha visto además, que la mutación p.K139E, localizada en la región N-terminal, pero lindando con el HD de SHOX2, altera su capacidad de interacción. Este mutante de SHOX2 es homólogo al p.K116E de SHOX, descrito en un paciente con TBI (Rappold et al., 2007), que, igualmente, reduce la capacidad de interacción de SHOX con SOX6 (Aza-Carmona et al., 2011).

Asimismo, hemos demostrado que, SHOX2 junto con SOX5 y SOX6 se coexpresan en todas las regiones de la placa de crecimiento humana a diferentes edades gestacionales. SOX5 y SOX6 son fundamentales en la formación de las columnas de condrocitos proliferativos y en la inhibición del paso del estadio de condrocitos proliferativos a pre-hipertróficos (Smits et al., 2001; 2004). Por su parte, SHOX2 regula el paso de condrocito proliferativo a hipertrófico (Cobb et al., 2006; Yu et al., 2007). Su patrón de coexpresión espacio-temporal, nos sugiere que SHOX2 podría participar en la regulación del paso de condrocito proliferativo a hipertrófico a través de

la interacción con SOX5/SOX6. De modo que, SOX5 y SOX6 serían capaces de homodimerizar entre ellos, se unirían a SHOX2, a través del HMG y del HD, respectivamente, formando un complejo multiproteico que podría regular dicho paso en la placa de crecimiento.

3. Importancia funcional de la identificación de las dianas transcripcionales de SHOX2

Debido a que SHOX transactiva directamente al promotor de *NPPB* (Marchini et al., 2007) y que SOX9 ejerce una función represora en la región reguladora de *NPPB* (datos no publicados), quisimos determinar el papel que desempeña SHOX2 sobre este gen. El gen *NPPB* codifica la proteína BNP (Brain Natriuretic Peptide). Existen diferentes evidencias de que BNP es un importante regulador de la osificación endocondral, como es el hecho de que ratones transgénicos para *Nppb* muestren defectos pronunciados en el crecimiento esquelético (Suda et al., 1998). Debido a la implicación de SHOX2 en el crecimiento humano y al papel que desempeña el trío de SOX en la condrogénesis, quisimos caracterizar por una parte, la posible regulación directa de SHOX2, y en cooperación con el trío de SOX por otra, sobre el promotor de *NPPB*. Demostramos que SHOX2 induce la expresión de *NPPB* activando su promotor y que esta activación es superior en presencia de los cofactores SOX5/SOX6. Estos resultados se confirmaron mediante el análisis de dos mutaciones de SHOX2. Tanto la mutación p.L155V, que reduce la habilidad de homodimerizar, como la p.Q234X, que carece del OAR, son incapaces de activar a *NPPB*.

Sin embargo, los resultados que obtuvimos al sobreexpresar SOX9 fueron ciertamente sorprendentes. SOX9 parece ejercer un efecto represor sobre el promotor de *NPPB*, mostrando así, la primera evidencia de que en presencia de SOX9 y en consecuencia, del trío de SOX, no hay actividad de *NPPB*.

SOX9 y SHOX2 se coexpresan en todos los condrocitos de la placa de crecimiento. La expresión de BNP está localizada en condrocitos proliferativos tardíos pre-hipertróficos e hipertróficos (Marchini et al., 2007). Por lo tanto, SOX9 y SHOX2, colocalizan con BNP en la zona proliferativa tardía, pre-hipertrófica e hipertrófica. En estas regiones, atendiendo al factor temporal y al número de células que sean capaces de expresar las tres proteínas, SOX9 ejercería una función represora sobre BNP mientras que en las células donde SOX9 no se expresa, SHOX2 podría inducir la activación de BNP. Esta represión, dependerá en todo momento del patrón de expresión temporal característico de las tres proteínas para cada momento del desarrollo.

Además de su implicación en el crecimiento, la función predominante de *Shox2* esta asociada al desarrollo del corazón, como se puede observar en diferentes modelos de ratones *knock-out* (Yu et al., 2005; Espinoza-Lewis et al., 2009; Puskaric et al., 2010). Por su parte, BNP es una hormona conocida principalmente por su función en corazón, constituyendo un biomarcador en el diagnóstico y pronóstico de pacientes con insuficiencia cardiaca (Maisel et al., 2008). Por la implicación de ambos en corazón, es fácil especular que *SHOX2* regularía la expresión de *NPPB* en corazón y que la alteración de esta vía, bien sea por sobreexpresión o represión de cualquiera de ellos, podría desencadenar un fallo cardiaco. Apoyaría nuestra hipótesis el hecho de que la sobreexpresión de BNP en ratones transgénicos causa una disminución de la presión sanguínea y del tamaño del corazón (Suda et al., 1998).

Esta hipótesis sería importante en los modelos de ratones *knock-out* para *Shox2* y podríamos proponer a *SHOX2* como gen candidato para el estudio mutacional en pacientes con defectos cardiacos o alteraciones en la estructura del paladar (debido a que *SHOX2* está expresado en paladar), ya que no se han encontrado mutaciones puntuales ni pequeñas/grandes deleciones en el gen *SHOX2* asociadas a ninguna patología humana. Por ello, alteraciones genéticas en las regiones reguladoras y codificantes del gen *SHOX2* podrían estar relacionadas con un acortamiento de las extremidades y/o anomalías en corazón.

La segunda diana descrita de *SHOX* es *ACAN*, se sabe que *SHOX* coopera con el trío de *SOX* en la activación de su *enhancer* (Aza-Carmona et al., 2011). Con estos antecedentes, quisimos determinar si *SHOX2* y el trío *SOX* también ejercen una función sobre la actividad del *enhancer* de *ACAN*. El gen *ACAN* codifica la proteína agrecano, que es un componente esencial de la matriz extracelular del cartílago. Al igual que ocurría con *SHOX*, *SHOX2* no es capaz de activar directamente el *enhancer* de *ACAN*, sino que su activación se produce a través de la cooperación con el trío de *SOX*. Estos resultados se confirmaron mediante el análisis de dos mutaciones de *SHOX2*, p.L155V y p.Q234X, las cuales disminuían la interacción.

Futuros experimentos con ChIP o EMSA nos permitirán determinar y caracterizar los sitios de unión localizados tanto en el *enhancer* de *ACAN* como en el promotor de *NPPB*, en los que *SHOX2*, *SHOX* y sus diferentes cofactores, *SOX5/SOX6* y *SOX9*, son capaces de unirse.

La tercera diana conocida de *SHOX* hasta la fecha, es el gen *FGFR3*. Se ha descrito que *FGFR3* es una diana transcripcional de *SHOX*, pero no lo es de *SHOX2* (Decker et al., 2011). *FGFR3* juega un papel crucial durante el desarrollo de las extremidades, puesto que inhibe la proliferación y promueve la diferenciación de los condrocitos actuando como un regulador negativo del crecimiento post-natal (Harada et

al., 2009). Mutaciones en *FGFR3* conducen a diferentes displasias esqueléticas incluyendo acondroplasia, hipocondroplasia o displasia tanatofórica de Tipo I y II (Horton et al., 2007; Passos-Bueno et al., 1999). Una de las características clínicas de los pacientes con alteraciones en *FGFR3* es un acortamiento desproporcionado de los huesos largos de las extremidades, especialmente en la región rizomélica de brazos y piernas (Naski et al., 1996). Por su parte, la expresión de *SHOX2* se detecta en las extremidades superiores hacia la región medial y proximal (rizomélica) (Yu et al., 2007). Con estas evidencias es difícil pensar, que *SHOX2* no esté implicado en la regulación de *FGFR3*.

Por ello proponemos que *SHOX2* no sería una diana directa de *FGFR3* (Decker et al., 2011), pero la cooperación de *SHOX2* con los cofactores, *SOX5/SOX6* y *SOX9*, activaría al promotor de *FGFR3*, tal y como ocurre con *ACAN*. Por ello sería necesario realizar futuros ensayos de luciferasa y EMSA para comprobar el papel que *SHOX2* en combinación con los diferentes cofactores ejercen sobre el promotor de *FGFR3*.

Por otra parte, propusimos a *Col2a1*, como una posible diana transcripcional de *SHOX2*, por ser un componente fundamental de la matriz extracelular, y por la implicación directa de *Sox9* junto con *L-Sox5/Sox6*, en su activación (Lefebvre et al., 1996; 1998). Datos preliminares indican que *SHOX2*, no es capaz de activar a *Col2a1*, ni en presencia del trío de *SOX* ni de manera directa. De hecho, los resultados muestran un descenso en la actividad de luciferasa en cualquier combinación en la que *SHOX2* estuviese presente.

En resumen y siguiendo el patrón de similitud entre ambas proteínas, hemos identificado, que las dos dianas transcripcionales de *SHOX*, *NPPB* y *ACAN*, también son dianas transcripcionales de *SHOX2*. De este modo, *SHOX2* es capaz de activar tanto directamente como en combinación con *SOX5* y *SOX6* al promotor de *NPPB* pero requiere la presencia del trío *SOX* en la activación del *enhancer* de *ACAN*. Estudios posteriores nos permitirán determinar si *SHOX2* en cooperación con los diferentes cofactores induciría la expresión de *FGFR3* activando su promotor y el posible papel represor de *SHOX2* sobre el *enhancer* de *Col2a1*. Por tanto, debemos concluir que *SHOX2* ejerce su acción reguladora sobre sus genes diana mediante diferentes mecanismos.

4. Identificación y caracterización de las interacciones proteicas entre SHOX2 y MAGED1

Otra proteína identificada en la interacción con SHOX2, fue MAGED1, un factor de transcripción implicado en procesos de transducción de señales y regulación del ciclo celular y apoptosis. Los estudios del doble híbrido de levaduras nos permitieron identificar al HD y OAR de SHOX2 y al IRD de MAGED1, como los dominios de interacción entre ambas proteínas.

Estos datos coinciden con los observados en la interacción entre SHOX y MAGED1, de los que se sabe que SHOX interacciona con MAGED1 a través del HD y OAR, y el IRD respectivamente (datos no publicados). Además nuestros hallazgos coinciden también con el hecho de que los factores de transcripción interactúan con otras proteínas vía el HD e IRD respectivamente (Grueneberg et al., 1995).

El IRD de MAGED1 es el dominio que permite la unión con otras proteínas implicadas en condrogénesis como son, *Dlx5* y *Msx2* (Masuda et al., 2001; Kuwajima et al., 2004). Estas proteínas están expresadas en el zeugopodio (Chin et al., 2007; Lallemand et al., 2005) e inducen diferenciación de los condrocitos en la placa de crecimiento (Ferrari y Kosher., 2002; Bendall et al., 2003; Amano et al., 2008). Se conoce que *Dlxin-1* (homólogo de MAGED1 en ratón) se une a *Dlx5* a través del IRD, y regula su función transcripcional (Masuda et al., 2001). Por tanto, proponemos que, SHOX2 y SHOX, podrían homo- o heterodimerizar entre ellas, y, o bien competir con *Dlx5* y *Msx2* en la unión al IRD de MAGED1 y ejercer su función como factores de transcripción promoviendo la diferenciación de los condrocitos en la placa de crecimiento o bien, cooperar con MAGED1 regulando la actividad transcripcional de *Dlx5* y *Msx2*. Esta interacción estaría sujeta al patrón espacial y temporal de expresión de estas proteínas.

NRAGE, homólogo de MAGED1 en rata, se caracteriza por actuar como un adaptador de proteínas y formar complejos multiproteicos que están implicados en la regulación del ciclo celular (Sasaki et al., 2005). Por su parte, SHOX conduce a una detención del ciclo celular en la fase G1, lo que conlleva a una acumulación de proteínas que juegan un papel importante en la regulación del ciclo celular (Marchini et al., 2004). Hasta el momento, no se ha descrito ninguna función de SHOX2 en la regulación de estos procesos, pero debido a que SHOX2 presenta una alta homología con SHOX e interacciona con MAGED1 a través del IRD, se puede especular que SHOX2 podría estar también implicado en dichos procesos.

Se sabe que Che-1 interacciona con NRAGE a través de su dominio MHD, localizado en la región C-terminal de la proteína, permitiendo la regulación de la

supervivencia o muerte celular (Grazia Di Certo et al., 2007). Proponemos que SHOX2, a través del IRD de MAGED1, y Che-1 a través del MHD, formarían un complejo multiproteico y que el ratio de expresión de estas proteínas, modularía la supervivencia celular y la apoptosis, al igual que la transcripción de otros genes implicados en esta vía.

5. Patrón de expresión de SHOX2 y SHOX y la implicación de su posible redundancia funcional durante el desarrollo embrionario humano

La función de SHOX en el crecimiento humano está más que demostrada ya que la haploinsuficiencia o ausencia de *SHOX* está asociada a dos displasias esqueléticas, DLW y DML. Dado que no existen patologías humanas asociadas al gen *SHOX2*, su función en el desarrollo es más incierta. Sin embargo, la implicación de *SHOX2* en el crecimiento es conocida gracias a los estudios realizados con su ortólogo *Shox2* en ratón (Yu et al., 2005; Gu et al., 2008; Espinoza-Lewis et al., 2009; Liu et al., 2012). De hecho, la ausencia de *Shox2* durante el desarrollo de las extremidades está asociada a un acortamiento severo del húmero y del fémur (Cobb et al., 2006; Yu et al., 2007) causado por defectos en el proceso de maduración de los condrocitos del estilopodio (Bobick et al., 2012).

Por la alta homología que existe entre ambas proteínas y la presencia de un idéntico homeodominio, hemos demostrado que SHOX y SHOX2, heterodimerizan, se unen a los mismos cofactores, SOX5/SOX6 y MAGED1, activan las mismas dianas de transcripción, siendo estas *NPPB* y *ACAN*, y presentan un mismo patrón de expresión. Por ello, proponemos que existe una complementaridad funcional durante el desarrollo embrionario humano, concretamente en la placa de crecimiento humana. La expresión de SHOX está localizada en la región mesomélica de las extremidades mientras que la expresión de SHOX2 está ubicada en la región rizomélica y en la parte media de las extremidades (Semina et al., 1998), existiendo un solapamiento en el patrón de expresión de ambas proteínas (Clement-Jones et al., 2000; Tiecke et al., 2006). Esta complementaridad funcional se pone de manifiesto en los pacientes con DML, que en ausencia completa de SHOX, presentan acortamiento mesomélico y rizomélico de las extremidades.

Otro dato a tener en cuenta y que sostiene nuestra hipótesis, es el fenotipo que muestran los pacientes con DLW. La deformidad de Madelung, característica de estos pacientes, presenta anomalías en cubito y en radio siendo más pronunciada en la región distal, se sabe que en esta región existe expresión predominante de SHOX y no se produce coexpresión de SHOX-SHOX2, por lo que SHOX2 no podría ejercer su función. Sin embargo, en la región más proximal del cubito y del radio, donde SHOX y SHOX2 se

coexpresan, la deformidad del cúbito y del radio está más atenuada, por lo que SHOX2 podría ejercer parte de la función de SHOX. Además de todo esto, es interesante tener en cuenta que los roedores, a diferencia del resto de los vertebrados, han perdido al gen *Shox* a lo largo de la evolución (Graves et al., 1998). Sin embargo, los ratones han compensado de alguna manera la pérdida de función del gen *Shox* ya que presentan un desarrollo normal de sus extremidades con sólo la presencia de su parólogo, *Shox2*.

Otra gran evidencia que nos lleva a apoyar esta hipótesis es la complementaridad funcional entre SHOX y *Shox2* en el desarrollo y regulación del SAN (Liu et al., 2011). Los reveladores resultados obtenidos en el *knock-in* de SHOX/*Shox2*, donde se observó que SHOX es capaz de reemplazar la función de *Shox2* mediante la represión de la expresión de *Nkx2.5* (Liu et al., 2011). Estos antecedentes, nos conducen a pensar que no sólo SHOX y *Shox2* son complementarios durante el desarrollo del corazón, sino que también lo pueden ser durante el desarrollo embrionario humano.

CAPÍTULO 2

Caracterización de la mutación p.A170P. Teorías sobre el origen de la mutación

Se identificaron doce familias con individuos afectados con DLW ó DML con la mutación c.508G>C (p.A170P) del gen *SHOX*, en heterocigosis o en homocigosis, respectivamente. Esta mutación tiene una alta penetrancia en todos los individuos portadores de la misma ya que está asociada de forma consistente a un fenotipo clínico de DLW en heterocigosis, ó de DML, en homocigosis, a diferencia de otras mutaciones del gen *SHOX*, que pueden aparecer asociadas a un fenotipo clínico variable característico bien de DLW o bien de talla baja sin rasgos displásicos aparentes. La alta penetrancia puede deberse a la importancia funcional de la Alanina 170, por residir dentro de uno de los cinco aminoácidos básicos que constituyen la señal de localización nuclear (AKCRK), situados en la hélice III del homeodominio de la proteína *SHOX* (Sabherwal et al., 2004a, b). Esta señal de localización nuclear (SLN) hace que la proteína *SHOX* se transloque al núcleo, independientemente del tipo celular (Rao et al., 2001). Los aminoácidos que conforman este motivo, son de naturaleza básica y están altamente conservados en todas las familias de las proteínas homeodominio de la clase *paired related*, y en particular los aminoácidos A170 y R173 (Banerjee-Basu y Baxeavanis, 2001). La presencia de mutaciones puntuales en esta región no sólo afecta a la localización de la proteína *SHOX* desde el citoplasma al núcleo, sino que también participa en otros procesos como son la unión al ADN, dimerización de la proteína (Schneider et al., 2005) e interacción con sus cofactores (Aza-Carmona et al., 2011).

Originariamente, dicha mutación fue identificada en una familia española, altamente consanguínea, de origen gitano (Sabherwal et al., 2004). Todas nuestras familias portadoras de la mutación p.A170P son españolas, y once de las doce familias estudiadas eran de origen gitano y mostraban un alto grado de consanguinidad. Mediante el uso de marcadores microsatélites, se estudió el haplotipo de las familias que presentaban dicha mutación, con el fin de investigar si existía o no un ancestro común. Los marcadores microsatélites revelaron la presencia de un haplotipo común con un tamaño comprendido entre 77 kb y 165 kb, incluyendo a *SHOX* y a sus flancos, en las doce familias estudiadas. El análisis de los microsatélites nos permitió además identificar otros procesos de recombinación adicionales alejados del gen *SHOX*. Esto es debido a que la frecuencia de recombinación de PAR1 es aproximadamente, 20 veces superior a la de todo el genoma (May et al., 2002). Si bien la probabilidad de encontrar el haplotipo asociado a la mutación p.A170P es muy baja en una población de individuos españoles sanos de etnia gitana (1 entre 40062 individuos), la misma es incluso inferior

en una población de individuos españoles no gitanos (1 por cada 390.000 individuos), lo que enfatiza la muy probable existencia de un ancestro común para la mutación p.A170P. Si a esto le añadimos que once de las doce familias son gitanas españolas, un grupo étnico altamente endogámico, debemos concluir que probablemente el fundador de dicha mutación podría ser español de origen gitano.

La población gitana es conocida por ser de origen indio, llegaron a Europa a través de los Balcanes hacia el s.XI-XII, extendiéndose por todos los países del Este y su dispersión por Europa data de finales del siglo XV (Fraser, 1992; Marushiakova y Popov, 1997). Hubo varias oleadas de migraciones produciéndose la entrada del colectivo gitano en España a principios del s.XV procedentes tanto de Europa como de África. Estudios genéticos han demostrado que existen mutaciones fundadoras compartidas entre grupos dispersos geográficamente, lingüística- y socialmente divergentes (Kalaydjieva et al., 1996, 2000; Piccolo et al., 1996; Abicht et al., 1999; Rogers et al., 2000; Varon et al., 2003).

Por ello, analizamos la genealogía de cada uno de los miembros estudiados, lo que nos permitió averiguar que la familia de uno de los individuos afectados, homocigoto para la mutación p.A170P, había migrado a España procedente de Europa del Este hace algunas generaciones. Por ello, quisimos ampliar nuestra investigación sobre su historia y la incidencia de esta mutación en otras poblaciones gitanas europeas, para lo cual establecimos una colaboración con la Dra. Luba Kalaydjieva, Laboratory of Molecular Genetics, Western Australian Institute for Medical Research. Mediante el estudio de una cohorte de 359 individuos sanos de origen gitano búlgaro y el genotipado de 25 tríos (padres-hijos), procedentes de familias con diferentes patologías, investigamos la frecuencia de la mutación p.A170P y del haplotipo asociado, sin identificar ningún portador de la mutación p.A170P ni la existencia del haplotipo asociado con dicha mutación. Este hecho, no descarta completamente la posibilidad de su presencia en el Este de Europa, donde podría estar confinada a sub-islotos y no estar representadas en el panel de individuos sanos, o que estuviera representada con una frecuencia baja. Lo que por otro lado, sustenta la probabilidad de que el fundador de la mutación sea español y de origen gitano.

Nuestros trabajos nos permitieron observar por primera vez, el efecto de la mutación p.A170P en la placa de crecimiento humana, concretamente en el antebrazo de un feto con DML, homocigoto para la mutación p.A170P. El análisis morfológico de la placa de crecimiento de dicho feto, reveló un mayor tamaño de los condrocitos de la zona de reserva y una forma más redondeada en comparación con los de la placa de crecimiento del feto normal. Además, los condrocitos de la zona proliferativa estaban desorganizados, perdiendo el agrupamiento en columnas característico de la placa de

crecimiento normal. No se observaron diferencias en los condrocitos hipertróficos. Mediante inmunohistoquímica pudimos demostrar que el patrón de expresión de SHOX se mantenía inalterado en la placa de crecimiento normal y en la placa del feto con DML. La proteína SHOX mutante, se expresa en la placa de crecimiento siguiendo el mismo patrón de expresión que la proteína SHOX normal, esto se debe a la mutación afecta la capacidad de translocación nuclear de la proteína, por tanto afectando su funcionalidad, sin alterar sin embargo sus niveles de expresión.

Además del estudio de la mutación p.A170P, identificamos dos familias españolas con DLW que presentan una nueva mutación (c.509C>A) que afecta al mismo aminoácido, p.A170D. A diferencia de las familias con la mutación p.A170P, las familias que tiene la mutación p.A170D no presentan un haplotipo común alrededor de *SHOX*, lo que indica que esta mutación ha ocurrido de manera independiente y no procede de un fundador común. Los estudios funcionales de dicha mutación demostraron que la misma, también impide la translocación de la proteína SHOX desde el citoplasma al núcleo, afectando por tanto a su funcionalidad como factor de transcripción. La identificación de otra mutación adicional afectando al mismo residuo y con características funcionales similares a la ya descrita anteriormente, indica que cualquier mutación que afecte a los aminoácidos que forman parte de la SLN tiene consecuencias en la función de SHOX como factor de transcripción.

Incluyendo los casos estudiados en la presente Tesis doctoral, se han descrito hasta seis mutaciones diferentes que afectan a los cinco aminoácidos de la señal de localización nuclear asociadas a 28 probandos que presentaban DLW/DML/TBI (datos no publicados y base de datos de SHOX: http://hyg-serv-01.hyg.uni-heidelberg.de/lovd/index.php?select_db=SHOX). Además, existen otras cinco mutaciones que afectan a aminoácidos adyacentes a la SLN, como son la Arginina 168 y 169, halladas en 14 pacientes que presentaban TBI/DLW (http://hyg-serv-01.hyg.uni-heidelberg.de/lovd/index.php?select_db=SHOX). Aunque estos dos aminoácidos no están incluidos en la señal de localización nuclear, se postula que debido a su naturaleza, aportan cierta basicidad o estabilidad a la SLN (AKCRK). Por tanto, un total de once mutaciones localizadas tanto en los aminoácidos que forman parte de la SLN (AKCRK) como los adyacentes (RRAKCRK) han sido descritas en esta región en pacientes que presentan DLW, DML ó TBI. El número de mutaciones halladas es mucho mayor que en otras regiones, sugiriendo que esta región podría ser un punto caliente para el gen *SHOX*, debido a la elevada frecuencia de aparición de mutaciones.

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 1

1. Las tres proteínas, SOX5, SOX6 y MAGED1, que interactúan con SHOX, también interaccionan con SHOX2. La interacción con estas proteínas se realiza a través del HD de SHOX2, del HMG de SOX6 y del IRD de MAGED1.
2. La expresión de SHOX, SOX5, SOX6, SOX9 y MAGED1 está colocalizada con SHOX2 en la placa de crecimiento en diferentes etapas del desarrollo embrionario humano.
3. Hemos identificado a *NPPB* y *ACAN*, dos de las tres dianas transcripcionales de SHOX, como dos nuevas dianas de transcripción de SHOX2.
4. SHOX2, del mismo modo que SHOX, activa directamente la expresión de *NPPB* mediante su unión al promotor. SHOX2 coopera con los cofactores, SOX5 y SOX6 produciendo un mayor aumento en la expresión de *NPPB*, sugiriendo la existencia de elementos de unión en la región promotora del gen, no descritos hasta el momento. El trío SOX, debido al efecto represor que ejerce SOX9, no participa en la activación del promotor.
5. SHOX2, al igual que SHOX, no es capaz de activar directamente la región reguladora de *ACAN* sino que coopera con el trío de SOX en la activación de su *enhancer*, localizado en el flanco 5' del gen.
6. La ausencia de mutaciones y deleciones en la región codificante del gen *SHOX2* y en los genes que codifican las proteínas con las que interactúa, SOX5 y SOX6, en una cohorte de pacientes con DLW, DML ó TBI indica que estos genes no están implicados como base molecular en la DLW, DML ó TBI.
7. La elevada homología existente entre las proteínas SHOX y SHOX2, la interacción con los mismos cofactores, la activación de las mismas dianas de transcripción y un patrón de expresión solapado, nos lleva a pensar que existe una complementareidad y/o redundancia funcional entre ambas proteínas durante el desarrollo embrionario, concretamente en la placa de crecimiento humana.

CAPITULO 2

1. Hemos identificado la mutación p.A170P en doce familias españolas con múltiples miembros afectados con DLW ó DML. La presencia de un haplotipo común alrededor de *SHOX* en dichas familias, sugiere la existencia de un ancestro común, posiblemente de etnia gitana. Por tanto, hemos identificado la primera mutación fundadora de *SHOX* en individuos con DLW y DML.

2. Por primera vez hemos observado la expresión de la proteína *SHOX* mutante en todas las regiones de la placa de crecimiento humana en un feto con DML. La placa de crecimiento epifisaria muestra diferencias en su morfología con respecto a la placa de crecimiento normal, pero la proteína *SHOX* mutante sigue el mismo patrón de expresión que la proteína *SHOX* normal, debido a que la mutación afecta a la capacidad de translocación nuclear de la proteína, sin alterar sus niveles de expresión.

3. Para mejorar el estudio genético, sugerimos analizar la mutación p.A170P como primer paso del análisis mutacional del gen *SHOX* en pacientes con DLW ó DML de etnia gitana.

4. Hemos identificado una nueva mutación localizada en el mismo aminoácido, p.A170D de *SHOX*, en dos familias españolas. Dicha proteína mutante afecta a la capacidad de translocación nuclear, impidiendo su función como factor de transcripción, siendo esta la causa de la patogenicidad en los individuos que la presentan.

5. En todos los casos estudiados hasta la fecha, las mutaciones p.A170P y p.A170D están asociadas a un fenotipo penetrante completo de DLW ó DML. Por tanto, este aminoácido en *SHOX*, altamente conservado en las proteínas homeodominio de la clase *paired*, posee una elevada importancia funcional.

BIBLIOGRAFÍA

- Abicht A, Stucka R, Karcagi V, Herczegfalvi A, Horvath R, Mortier W, Schara U, Ramaekers V, Jost W, Brunner J, Janssen G, Seidel U, Schlotter B, Muller-Felber W, Pongratz D, Rudel R, Lochmuller H.** (1999). A common mutation (epsilon1267delG) in congenital myasthenic patients of Gypsy ethnic origin. *Neurology* 53:1564-1569.
- Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, Compston JE.** (1997). The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3493-3497.
- Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Grigorescu F, Lautier C, Keller E, Kiess W, Klammt J, Kratzsch J, Osgood D, Pfaffle R, Raile K, Seidel B, Smith RJ, Chernauek SD.** (2003). IGF1 receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med* 349, 2211-2222.
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B.** (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16, 2813-2828.
- Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, McCrea PD, de Crombrughe B.** (2004). Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev* 18(9), 1072-87.
- Amano K, Ichida F, Sugita A, Hata K, Wada M, Takigawa Y, Nakanishi M, Kogo M, Nishimura R, Yoneda T.** (2008). MSX2 stimulates chondrocyte maturation by controlling Ihh expression. *J Biol Chem* 283(43), 29513-21.
- Anderson IJ, Tsipouras P, Scher C, Ramesar RS, Martell RW, Beighton P.** (1990). Spondyloepiphyseal dysplasia, mild autosomal dominant type is not due to primary defects of type II collagen. *Am J Med Genet* 37(2):272-6.
- Aza-Carmona M, Shears DJ, Yuste-Checa P, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, Belinchón A, Benito-Sanz S, Rodríguez JI, Argente J, Campos-Barros A, Scambler PJ, Heath KE.** (2011). SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer. *Hum Mol Genet* 20: 1547-1559.
- Baldwin CT, Reginato AM, Prockop DJ.** (1989). A new epidermal growth factor-like domain in the human core protein for the large cartilage-specific proteoglycan: evidence for alternative splicing of the domain. *J Biol Chem* 264:15747-15750.
- Ballock RT, O'Keefe RJ.** (2003). Physiology and pathophysiology of the growth plate. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69(2):123-43.
- Banerjee-Basu S, Baxeavanis AD.** (2001). Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors. *Nucleic Acids Res* 29(15), 3258-69.
- Barker PA, Salehi A.** (2002). The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *J Neurosci Res* 67(6), 705-12. Review.
- Beier F, Lee RJ, Taylor AC, Pestell RG, LuValle P.** (1999). Identification of the cyclin D1 gene as a target of activating transcription factor 2 in chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1433-8.
- Belin V, Cusin V, Viot G, Girlich D, Toutain A, Moncla A, Vekemans M, Le Merrer M,**

- Munnich A, Cormier-Daire V.** (1998). SHOX mutations in dyschondrosteosis (Léri-Weill syndrome). *Nat Genet* 19(1), 67-9.
- Bendall AJ, Hu G, Levi G, Abate-Shen C.** (2003). Dlx5 regulates chondrocyte differentiation at multiple stages. *Int J Dev Biol* 47(5), 335-44.
- Benito-Sanz S, Thomas NS, Huber C, Gorbenko del Blanco D, Aza-Carmona M, Crolla JA, Maloney V, Rappold G, Argente J, Campos-Barros A, Cormier-Daire V, Heath KE.** (2005). A novel class of Pseudoautosomal region 1 deletions downstream of SHOX is associated with Léri-Weill dyschondrosteosis. *Am J Hum Genet* 77(4), 533-44.
- Benito-Sanz S, Gorbenko del Blanco D, Aza-Carmona M, Magano LF, Lapunzina P, Argente J, Campos-Barros A, Heath KE.** (2006a). PAR1 deletions downstream of SHOX are the most frequent defect in a Spanish cohort of Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) probands. *Hum Mutat* 27(10), 1062.
- Benito-Sanz S, Gorbenko del Blanco D, Huber C, Thomas NS, Aza-Carmona M, Bunyan D, Maloney V, Argente J, Cormier-Daire V, Campos-Barros A, Heath KE.** (2006b). Characterization of SHOX deletions in Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) reveals genetic heterogeneity and no recombination hotspots. *Am J Hum Genet* 79(2), 409-14.
- Benito-Sanz S, Barroso E, Heine-Suñer D, Hisado-Oliva A, Romanelli V, Rosell J, Aragonés A, Caimari M, Argente J, Ross JL, Zinn AR, Gracia R, Lapunzina P, Campos-Barros A, Heath KE.** (2011). Clinical and molecular evaluation of SHOX/PAR1 duplications in Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and idiopathic short stature (ISS). *J Clin Endocrinol Metab* 96: E404–E412.
- Benito-Sanz S, Aza-Carmona M, Rodríguez-Estevez A, Rica-Etxebarria I, Gracia R, Campos-Barros A, Heath KE.** (2012). Identification of the first PAR1 deletion encompassing upstream SHOX enhancers in a family with idiopathic short stature. *Eur J Hum Genet* 20(1):125-7.
- Benito-Sanz S, Royo JL, Barroso E, Paumard-Hernández B, Barreda-Bonis AC, Liu P, Gracia R, Lupski JR, Campos-Barros Á, Gómez-Skarmeta JL, Heath KE.** (2012). Identification of the first recurrent PAR1 deletion in Léri-Weill dyschondrosteosis and idiopathic short stature reveals the presence of a novel SHOX enhancer. *J Med Genet* 49(7):442-50.
- Bertorelli R, Capone L, Ambrosetti F, Garavelli L, Varriale L, Mazza V, Stanghellini I, Percesepe A, Forabosco A.** (2007). The homozygous deletion of the 3' enhancer of the SHOX gene causes Langer mesomelic dysplasia. *Clin Genet* 72(5), 490-1.
- Bex M, Bouillon R.** (2003). Growth hormone and bone health. *Horm Res* 2003;60 Suppl 3:80-6.
- Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B.** (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22, 85-89.
- Binder G, Ranke MB, Martin DD.** (2003). Auxology is a valuable instrument for the clinical diagnosis of SHOX haploinsufficiency in school-age children with unexplained short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 88(10), 4891-6.
- Binder G.** (2011). Growth hormone deficiency: new approaches to the diagnosis. *Pediatr Endocrinol Rev* 9 Suppl 1:535-7. Review.

- Blaschke RJ, Monaghan AP, Schiller S, Schechinger B, Rao E, Padilla-Nash H, Ried T, Rappold GA.** (1998). SHOT, a SHOX-related homeobox gene, is implicated in craniofacial, brain, heart, and limb development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5), 2406-11.
- Blaschke RJ, Töpfer C, Marchini A, Steinbeisser H, Janssen JW, Rappold GA.** (2003). Transcriptional and translational regulation of the Léri-Weill and Turner syndrome homeobox gene *SHOX*. *J Biol Chem* 278(48), 47820-6.
- Blaschke RJ, Hahurij ND, Kuijper S, Just S, Wisse LJ, Deissler K, Maxelon T, Anastassiadis K, Spitzer J, Hardt SE, Schöler H, Feitsma H, Rottbauer W, Blum M, Meijlink F, Rappold G, Gittenberger-de Groot AC.** (2007). Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor *Shox2* in sinoatrial and pacemaking development. *Circulation* 115(14), 1830-8.
- Bobick BE, Cobb J.** (2012) *Shox2* regulates progression through chondrogenesis in the mouse proximal limb. *J Cell Sci* 2012 Oct 4 homeodomain protein *Cart1* has an attenuating role in vivo. *Mech Dev* 120(2), 241-52.
- Briggs MD, Hoffman MG, King LM, Olsen AS, Mohrenweiser H, Leroy JG, Mortier G.R, Rimoin DL, Lachman RS, Gaines ES, Cekleniak J.A, Knowlton RG, Cohn DH.** (1995) Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene. *Nature Genet* 10: 330-336, 1995.
- Buckler JM, Willgerodt H, Keller E.** (1986). Growth in thyrotoxicosis. *Arch Dis Child* 61, 464-471.
- Campos-Barros A, Benito-Sanz S, Ross JL, Zinn AR, Heath KE.** (2007). Compound heterozygosity of *SHOX*-encompassing and downstream *PAR1* deletions results in Langer mesomelic dysplasia (LMD). *Am J Med Genet* 143A(9), 933-8.
- Cassorla FG, Skerda MC, Valk IM, Hung W, Cutler GB Jr, Loriaux DL.** (1984). The effects of sex steroids on ulnar growth during adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 58(4):717-20.
- Chagin AS, Säwendahl L.** (2007). Estrogens and growth:review. *Pediatr Endocrinol Rev* 4 (4):329-334.
- Chin HJ, Fisher MC, Li Y, Ferrari D, Wang CK, Lichtler AC, Dealy CN, Kosher RA.** (2007). Studies on the role of *Dlx5* in regulation of chondrocyte differentiation during endochondral ossification in the developing mouse limb. *Dev Growth Differ* 49(6), 515-21.
- Chou A, Dekker N, Jordan RC.** (2009) Identification of novel fibroblast growth factor 3 gene mutations in actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107(4): 535-541.
- Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, Zeller R, Robson SC, Binder G, Glass I, Strachan T, Lindsay S, Rappold GA.** (2000). The short stature homeobox gene *SHOX* is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet* 9(5), 695-702.
- Cobb J, Dierich A, Huss-Garcia Y, Duboule D.** (2006). A mouse model for human short-stature syndromes identifies *Shox2* as an upstream regulator of *Runx2* during long-bone development. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(12), 4511-5.

Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, Chernausk SD, Savage MO, Wit JM; 2007 ISS Consensus Workshop participants. (2008). Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *J Clin Endocrinol Metab* 93(11), 4210-7.

Cormier-Daire V, Huber C, Munnich A. (2001). Allelic and nonallelic heterogeneity in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Am J Med Genet* 106(4), 272-4.

Daughaday WH. (2000). Growth hormone axis overview-somatomedin hypothesis. *Pediatr Nephrol* 14(7): 537-40.

Decker E, Durand C, Bender S, Rödelberger C, Glaser A, Hecht J, Schneider KU, Rappold G. (2011). FGFR3 is a target of the homeobox transcription factor SHOX in limb development. *Hum Mol Genet* 20(8):1524-35.

Deere M, Sanford T, Francomano CA, Daniels K, Hecht JT. (1999). Identification of nine novel mutations in cartilage oligomeric matrix protein in patients with pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *Am J Med Genet* 27;85(5):486-90.

Di Certo MG, Corbi N, Bruno T, Iezzi S, De Nicola F, Desantis A, Ciotti MT, Mattei E, Floridi A, Fanciulli M, Passananti C. (2007). NRAGE associates with the anti-apoptotic factor Che-1 and regulates its degradation to induce cell death. *J Cell Sci* 1;120 (11):1852-8.

Ellison JW, Wardak Z, Young MF, Gehron Robey P, Laig-Webster M, Chiong W. (1997). PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum Mol Genet* 6(8), 1341-7.

Espinoza-Lewis RA, Ling Yu, He F, Liu H, Tang R, Shi J, Xiaoxiao Sun, Martin JF, Wang D, Yang J, Chen YP. (2009). Shox2 is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing Nkx2-5. *Dev Biol* 327:376-385.

Eswarakumar VP, Ozcan F, Lew ED, Bae JH, Tomé F, Booth CJ, Adams DJ, Lax I, Schlessinger J. (2006). Attenuation of signaling pathways stimulated by pathologically activated FGF-receptor 2 mutants prevents craniosynostosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(49): 18603-18608.

Ferrari D, Kosher RA. (2002). Dlx5 is a positive regulator of chondrocyte differentiation during endochondral ossification. *Dev Biol* 252(2), 257-70.

Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kowk G, Weller PA, Stevanović M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN. (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372(6506), 525-30.

Fukami M, Kato F, Tajima T, Yokoya S, Ogata T. (2006). Transactivation function of an approximately 800-bp evolutionarily conserved sequence at the SHOX 3' region: implication for the downstream enhancer. *Am J Hum Genet* 78(1), 167-70.

Fraser A (1992) *The Gypsies*. Blackwell Publishers, Oxford.

- Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wüthrich K.** (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78(2), 211-23. Review.
- Gross S, Krause Y, Wuelling M, Vortkamp A.** (2012). Hoxa11 and Hoxd11 regulate chondrocyte differentiation upstream of Runx2 and Shox2 in mice. *PLoS One* 7(8):e43553.
- Grueneberg DA, Simon KJ, Brennan K, Gilman M.** (1995). Sequence-specific targeting of nuclear signal transduction pathways by homeodomain proteins. *Mol Cell Biol.* 15(6):3318-26.
- Gu S, Wei N, Yu X, Jiang Y, Fei J, Chen Y.** (2008). Shox2-deficiency leads to dysplasia and ankylosis of the temporomandibular joint in mice. *Mech Dev* 125, 729-742.
- Hall J.G and Gilchrist D.M.** (1990). Turner syndrome and its variants. *Pediatr Clin North Am* 37, 1421-1440.
- Han Y, Lefebvre V.** (2008). L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Mol Cell Biol* 28(16), 4999-5013.
- Harada N, Narimatsu N, Kurihara H, Nakagata N, Okajima K.** (2009). Stimulation of sensory neurons improves cognitive function by promoting the hippocampal production of insulin-like growth factor-I in mice. *Transl Res* 154(2):90-102.
- Horton WE, Yamada Y, Hassell JR.** (1987). Retinoic acid rapidly reduces cartilage matrix synthesis by altering gene transcription in chondrocytes. *Dev Biol* 123(2):508-16.
- Horton Jr WE, Wang L, Bradham D, Precht P, Balakir R.** (1992). The control of expression of type II collagen: relevance to cartilage disease. *Cell Biol* 11:193-198.
- Horton WA.** (1993). Morphology of connective tissue: cartilage. In: McCusick V, ed. *Connective tissue and its heritable disorders*. New York: Wiley-Liss, Inc.; 641-675.
- Horton WA, Hall JG, Hecht JT.** (2007). Achondroplasia. *Lancet* 370: 162-172.
- Kalaydjieva L, Gresham D, Calafell F.** (2000). Genetic studies of the Roma (Gypsies): a review. *BMC Med Genet* 2:5.
- Kalaydjieva L, Hallmayer J, Chandler D, Savov A, Nikolova A, Angelicheva D, King RH, Ishpekova B, Honeyman K, Calafell F, Shmarov A, Petrova J, Turnev I, Hristova A, Moskov M, Stancheva S, Petkova I, Bittles AH, Georgieva V, Middleton L, Thomas PK.** (1996). Gene mapping in Gypsies identifies a novel demyelinating neuropathy on chromosome 8q24. *Nat Genet* 14(2):214-7.
- Kofoed EM, Hwa V, Little B, Woods KA, Buckway CK, Tsubaki J, Pratt KL, Bezrodnik L, Jasper H, Tepper A, Heinrich JJ, Rosenfeld RG.** (2003). Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation. *N Engl J Med* 349, 1139-1147.
- Kragelung C, Gronning B, Kober L, Hildebrandt P, Steffensen R.** (2005). N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in stable coronary heart disease. *N Engl J Med* 352: 666-675.

- Krohn K, Haffner D, Hugel U, Himmele R, Klaus G, Mehls O, Schaefer F.** (2003). 1, 25(OH)2D3 and dihydrotestosterone interact to regulate proliferation and differentiation of epiphyseal chondrocytes. *Calcif Tissue Int* 73, 400-410.
- Kronenberg HM.** (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423(6937), 332-6. Review.
- Kronenberg HM.** (2006) PTHrP and skeletal development. *Ann NY Acad Sci* 1068, 1-13.
- Kuwajima T, Taniura H, Nishimura I, Yoshikawa K.** (2004). Necdin interacts with the Msx2 homeodomain protein via MAGE-D1 to promote myogenic differentiation of C2C12 cells. *J Biol Chem* 279(39), 40484-93.
- Kuhnle U, Schwarz HP, Lohrs U, Stengel-Ruthkowski S, Cleve H, Braun A.** (1993). A familial true hermaphroditism: paternal and maternal transmission of true hermaphroditism (46XX) and XX maleness in the absence of Y-chromosomal sequences. *Hum Genet* 92:571-576.
- Kuwajima T, Taniura H, Nishimura I, Yoshikawa K.** (2004). Necdin interacts with the Msx2 homeodomain protein via MAGE-D1 to promote myogenic differentiation of C2C12 cells. *J Biol Chem* 279(39), 40484-93.
- Lallemand Y, Nicola MA, Ramos C, Bach A, Cloment CS, Robert B.** (2005). Analysis of Msx1; Msx2 double mutants reveals multiple roles for Msx genes in limb development. *Development* 132, 3003-14.
- Langer Jr LO** (1967): Mesomelic dwarfism of the hypoplastic ulna, fibula, mandible type. *Radiology*; 89: 654-660.
- Leach RM Jr, Sokol C, McMurtry JP.** (1997). Immunolocalization of basic fibroblast growth factor in porcine epiphyseal growth plate. *Domest Anim Endocrinol* 14(2):129-32.
- Lee K, Lanske B, Karaplis AC, Deeds JD, Kohno H, Nissenson RA, Kronenberg HM, Segre GV.** (1996). Parathyroid hormone-related peptide delays terminal differentiation of chondrocytes during endochondral bone development. *Endocrinology* 137(11), 5109-5118.
- Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B.** (1997). SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro- α 1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 17, 2336-2346.
- Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B.** (1998). A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J* 17, 5718-5733.
- Lefebvre V.** (2002). Toward understanding the functions of the two highly related Sox5 and Sox6 genes. *J Bone Miner Metab* 20(3):121-30.
- Ling Y, Rios HF, Myers ER, Lu Y, Feng JQ, Boskey AL.** (2005). DMP1 depletion decreases bone mineralization in vivo: an FTIR imaging analysis. *J Bone Miner Res* 20(12):2169-77.
- Ling Y, Yang Y, Lu N, You QD, Wang S, Gao Y, Chen Y, Guo QL.** (2007). Endostar, a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect via blocking VEGF-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1 of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 14;361(1):79-84.

- Liu CJ, Zhang Y, Xu K, Parsons D, Alfonso D, Di Cesare PE.** (2007). Transcriptional activation of cartilage oligomeric matrix protein by Sox9, Sox5, and Sox6 transcription factors and CBP/p300 coactivators. *Front Biosci* 12, 3899-910.
- Liu H, Chen CH, Espinoza-Lewis RA, Jiao Z, Sheu I, Hu X, Lin M, Zhang Y, Chen Y.** (2011). Functional redundancy between human SHOX and mouse Shox2 genes in the regulation of sinoatrial node formation and pacemaking function. *J Biol Chem* 13;286(19):17029-38.
- Long F, Schipani E, Asahara H, Kronenberg H, Montminy M.** (2001). The CREB family of activators is required for endochondral bone development. *Development* 128, 541-50.
- Long F, Joeng KS, Xuan S, Efstratiadis A, McMahon AP.** (2006). Independent regulation of skeletal growth by Ihh and IGF signaling. *Dev Biol* 298(1), 327–333.
- Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A.** (2001). Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev Biol* 1;229(1):141-62.
- Maisel A, Mueller C, Adams K Jr, Anker SD, Aspromonte N, Cleland JG, Cohen-Solal A, Dahlstrom U, DeMaria A, Di Somma S, Filippatos GS, Fonarow GC, Jourdain P, Komajda M, Liu PP, McDonagh T, McDonald K, Mebazaa A, Nieminen MS, Peacock WF, Tubaro M, Valle R, Vanderhyden M, Yancy CW, Zannad F, Braunwald E.** (2008). State of the art: using natriuretic peptide levels in clinical practice. *Eur J Heart Fail* 10(9):824-39.
- Maddox BK, Mokashi A, Keene DR, Bächinger HP.** (2000). A cartilage oligomeric matrix protein mutation associated with pseudoachondroplasia changes the structural and functional properties of the type 3 domain. *J Biol Chem* 14;275(15):11412-7.
- Maor G, Segev Y, Phillip M.** (1999). Testosterone stimulates insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I-receptor gene expression in the mandibular condyle-a model of endochondral ossification. *Endocrinology* 140, 1901-1910.
- Marchini A, Marttila T, Winter A, Caldeira S, Malanchi I, Blaschke RJ, Häcker B, Rao E, Karperien M, Wit JM, Richter W, Tommasino M, Rappold GA.** (2004). The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J Biol Chem* 279(35), 37103-14.
- Marchini A, Daeffler L, Marttila T, Schneider KU, Blaschke RJ, Schnölzer M, Rommelaere J, Rappold G.** (2006). Phosphorylation on Ser106 modulates the cellular functions of the SHOX homeodomain protein. *J Mol Biol* 355(3), 590-603.
- Marchini A, Häcker B, Marttila T, Hesse V, Emons J, Weiss B, Karperien M, Rappold G.** (2007). BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Hum Mol Genet* 16(24), 3081-7.
- Marushiakova E, Popov V.** (1997) Gypsies (Roma) in Bulgaria. Peter Lang, Frankfurt am Main University of Hertfordshire Press, Hatfield, England, pp 370-388.
- Massagué J.** (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-791.

- Masuda Y, Sasaki A, Shibuya H, Ueno N, Ikeda K, Watanabe K.** (2001). Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function. *J Biol Chem* 276(7), 5331-8.
- May CA, Shone AC, Kalydjieva L, Sajantila A, Jeffreys AJ.** (2002). Crossover clustering and rapid decay of linkage disequilibrium in the Xp/Yp pseudoautosomal gene SHOX. *Nat Genet* 31: 272-275.
- McGinnis W, Krumlauf R.** (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 24;68(2):283-302.
- Mello MA, Tuan RS.** (1999). High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35(5):262-9.
- Meyer T, Marg A, Lemke P, Wiesner B & Vinkemeier U.** (2003). DNA binding controls inactivation and nuclear accumulation of the transcription factor Stat1. *Genes Dev* 17, 1992-2005.
- Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR.** (1997). Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89(5), 773-9.
- Munns CF, Glass IA, LaBrom R, Hayes M, Flanagan S, Berry M, Hyland VJ, Batch JA, Phillips GE, Vickers D.** (2001). Histopathological analysis of Léri-Weill dyschondrosteosis: disordered growth plate. *Hand Surg* 6(1), 13-23.
- Munns CJ, Haase HR, Crowther LM, Hayes MT, Blaschke R, Rappold G, Glass IA, Batch JA.** (2004). Expression of SHOX in human fetal and childhood growth plate. *J Clin Endocrinol Metab* 89(8), 4130-5.
- Muragaki Y, Mariman EC, van Beersum SE, Perälä M, van Mourik JB, Warman ML, Hamel BC, Olsen BR.** (1996). A mutation in COL9A2 causes multiple epiphyseal dysplasia (EDM2). *Ann N Y Acad Sci* 8;785:303-6.
- Nagy A, Erzsébet K, Rentsendorj O, Molnár A, Szénasi T, Sinko I, Zvara A, Thottathil Oommen S, Barta E, Puska's LG, Lefebvre V, and Kiss I.** (2010). Evolutionarily Conserved, Growth Plate Zone-Specific Regulation of the Matrilin-1 Promoter: L-Sox5/Sox6 and Nfi Factors Bound near TATA Finely Tune Activation by Sox9. *Molecular and cellular biology* (31)686-699.
- Naski MC, Colvin JS, Coffin JD, Ornitz DM.** (1998). Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development* 125, 4977-4988.
- Nicolosi A, Caruso-Nicoletti M.** (2011). Epidemiology of SHOX deficiency. *J Endocrinol Invest.* 33(6 Suppl):7-10.
- Nilsson O, Chrysis D, Pajulo O, Boman A, Holst M, Rubinstein J, Martin RE, Savendahl L.** (2003). Localization of estrogen receptors-alpha and -beta and androgen receptor in the human growth plate at different pubertal stages. *J Endocrinol* 177, 319-326.
- Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J.** (2005). Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res* 64(4), 157-65. Review.

- Noguchi K, Watanabe Y, Fuse T, Takizawa M.** (2010). A new chondrogenic differentiation initiator with the ability to up-regulate SOX trio expression. *J Pharmacol Sci* 112(1):89-97.
- Ohlsson C, Vidal O.** (1998). Effects of growth hormone and insulin-like growth factors on human osteoblasts. *Eur J Clin Invest* 1998 28(3):184-6.
- Ohlsson C, Nilsson A, Isaksson O, Lindahl A.** (1992). Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 9826-9830.
- Passos-Bueno MR, Wilcox WR, Jabs EW, Sertie AL, Alonso LG, Kitoh H.** (1999). Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. *Hum Mutat* 14:115-125.
- Piccolo F, Jeanpierre M, Leturcq F, Dode C, Azibi K, Toutain A, Merlini L, Jarre L, Navarro C, Krishnamoorthy R, Tome FM, Urtizberea JA, Beckmann JS, Campbell KP, Kaplan JC.** (1996). A founder mutation in the gamma-sarcoglycan gene of gypsies possibly predating their migration out of India. *Hum Mol Genet* 5:2019-2022.
- Pinheiro PL, Cardoso JC, Power DM, Canário AV.** (2012). Functional characterization and evolution of PTH/PTHrP receptors: insights from the chicken. *BMC Evol Biol* 6;12:110.
- Peters DP, Harrison DA, Brandt CR.** (1993). Heterogeneity of type I collagen expression in human corneal keratoconus fibroblasts. *Ophthalmic Res* 25(5):273-9.
- Puskaric S, Schmitteckert S, Mori AD, Glaser A, Schneider KU, Bruneau BG, Blaschke RJ, Steinbeisser H, Rappold G.** (2010). Shox2 mediates Tbx5 activity by regulating Bmp4 in the pacemaker region of the developing heart. *Hum Mol Genet* 19(23):4625-33.
- Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M, Nordsiek G, Heinrich U, Breuning MH, Ranke MB, Rosenthal A, Ogata T, Rappold GA.** (1997). Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 16(1), 54-63.
- Rao E, Blaschke RJ, Marchini A, Niesler B, Burnett M, Rappold GA.** (2001). The Léri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum Mol Genet* 10(26), 3083-91.
- Rappold G, Fukami M, Niesler B, Schiller S, Zumkeller W, Bettendorf M, Heinrich U, Vlachopapadoupoulou E, Reinehr T, Onigata K, Ogata T.** (2002). Deletions of the homeobox gene SHOX (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 87(3), 1402-6.
- Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP, Crowe BJ, Roeth R, Quigley CA, Ross JL, Niesler B.** (2007). Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J Med Genet* 44(5), 306-13.
- Reddi AH.** (2001). Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1(Pt 1):S1-6.
- Reinecke M, Schmid AC, Heyberger-Meyer B, Hunziker EB, Zapf J.** (2000). Effect of growth hormone and insulin-like growth factor I (IGF-I) on the expression of IGF-I

messenger ribonucleic acid and peptide in rat tibial growth plate and articular chondrocytes in vivo. *Endocrinology* 141(8):2847-53.

Robledo RF, Rajan L, Li X, Lufkin T. (2002). The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes Dev* 16, 1089-1101.

Rodrigo I, Hill RE, Balling R, Münsterberg A, Imai K. (2003). Pax1 and Pax9 activate Bapx1 to induce chondrogenic differentiation in the sclerotome. *Development* 130(3), 473-82.

Rogers T, Chandler D, Angelicheva D, Thomas PK, Youl B, Tournev I, Gergelcheva V, Kalaydjieva L. (2000). A novel locus for autosomal recessive peripheral neuropathy in the EGR2 region on 10q23. *Am J Hum Genet* 67:664-671.

Rosenfeld RG, Rosenbloom AL, Guevara-Aguirre J. (1994). Growth hormone (GH) insensitivity due to primary GH receptor deficiency. *Endocr Rev* 15, 369-390.

Ross JL, Scott C Jr, Marttila P, Kowal K, Nass A, Papenhausen P, Abboudi J, Osterman L, Kushner H, Carter P, Ezaki M, Elder F, Wei F, Chen H, Zinn AR. (2001). Phenotypes Associated with SHOX Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 86(12), 5674-80.

Sävendahl L. (2005). Hormonal regulation of growth plate cartilage. *Horm Res* 64 Suppl 2:94-7.

Sabherwal N, Bangs F, Röth R, Weiss B, Jantz K, Tiecke E, Hinkel GK, Spaich C, Hauffa BP, van der Kamp H, Kapeller J, Tickle C, Rappold G. (2007). Long-range conserved noncoding SHOX sequences regulate expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. *Hum Mol Genet* 16(2), 210-22.

Sabherwal N, Schneider KU, Blaschke RJ, Marchini A, Rappold G. (2004a). Impairment of SHOX nuclear localization as a cause for Léri-Weill syndrome. *J Cell Sci* 117(Pt 14), 3041-8.

Sabherwal N, Blaschke RJ, Marchini A, Heine-Suner D, Rosell J, Ferragut J, Blum WF, Rappold G. (2004b). A novel point mutation A170P in the SHOX gene defines impaired nuclear translocation as a molecular cause for Léri-Weill dyschondrosteosis and Langer dysplasia. *J Med Genet* 41(6), e83.

Sabherwal N, Blaschke RJ, Marchini A, Heine-Suner D, Rosell J, Ferragut J, Blum WF, Rappold G. A novel point mutation A170P in the SHOX gene defines impaired nuclear translocation as a molecular cause for Léri-Weill dyschondrosteosis and Langer dysplasia. *J Med Genet* 2004; 41: e83.

Saito T, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. (2007). S100A1 and S100B, transcriptional targets of SOX trio, inhibit terminal differentiation of chondrocytes. *EMBO Rep* 8(5):504-9.

Sävendahl L. (2005). Hormonal regulation of growth plate cartilage. *Horm Res* 2005;64 Suppl 2:94-7.

Schneider KU, Marchini A, Sabherwal N, Röth R, Niesler B, Marttila T, Blaschke RJ,

- Lawson M, Dumic M, Rappold G.** (2005). Alteration of DNA binding, dimerization, and nuclear translocation of SHOX homeodomain mutations identified in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis. *Hum Mutat* 26(1), 44-52.
- Semina EV, Reiter RS, Murray JC.** (1998). A new human homeobox gene OGI2X is a member of the most conserved homeobox gene family and is expressed during heart development in mouse. *Hum Mol Genet* 7(3), 415-22.
- Shears DJ, Vassal HJ, Goodman FR, Palmer RW, Reardon W, Superti-Furga A, Scambler PJ, Winter RM.** (1998). Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nat Genet* 19(1), 70-3.
- Shears DJ, Guillen-Navarro E, Sempere-Miralles M, Domingo-Jimenez R, Scambler PJ, Winter RM.** (2002). Pseudodominant inheritance of Langer mesomelic dysplasia caused by a SHOX homeobox missense mutation. *Am J Med Genet* 110(2), 153-7.
- Sjögren K, Jansson JO, Isaksson OG, Ohlsson C.** (2002). A model for tissue-specific inducible insulin-like growth factor-I (IGF-I) inactivation to determine the physiological role of liver-derived IGF-I. *Endocrine* 19(3):249-56.
- Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B, Lefebvre V.** (2001). The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell* 1, 277-290.
- Smits P, Dy P, Mitra S, Lefebvre V.** (2004). Sox5 and Sox6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate. *J Cell Biol* 164, 747-758.
- Sobradillo B, Aguirre A, Aresti U, Bilbao A, Fernández-Ramos C, Lizárraga A, Lorenzo H, Madariaga L, Rica I, Ruiz I.** (2002). Curvas y Tablas de crecimiento (Estudios Longitudinal y Transversal). Fundación Faustino Orbegoiz Eizaguirre, 1-36.
- Solomon LA, Berube NG, Beier F.** (2008). Transcriptional regulators of chondrocyte Hypertrophy. *Birth Defects Research (Part C)* 84:123-130.
- Spranger J, Winterpacht A, Zabel B.** (1994). The type II collagenopathies: a spectrum of chondrodysplasias. *Eur J Pediatr* 153: 56-65.
- Spranger JW, Wiedemann HR.** (1996). Dysplasia spondyloepiphysaria congenita. (Letter) *Lancet* 288: 642. Note: Originally Volume II.
- Spranger JW, Langer LO.** (1974). Spondyloepiphyseal dysplasias. *Birth Defects Orig. Art. Ser.* 10: 19-61.
- Stattin EL, Wiklund F, Lindblom K, Onnerfjord P, Jonsson BA, Tegner Y, Sasaki T, Struglics A, Lohmander S, Dahl N, Heinegård D, Aspberg A.** (2010). A missense mutation in the aggrecan C-type lectin domain disrupts extracellular matrix interactions and causes dominant familial osteochondritis dissecans. *Am J Hum Genet* 86(2):126-37.
- Stevens DA, Hasserjian RP, Robson H, Siebler T, Shalet SM, Williams GR.** (2000). Thyroid hormones regulate hypertrophic chondrocyte differentiation and expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor during endochondral bone formation. *J Bone Miner Res* 15(12):2431-42.
- Stickler GB, Belau PG, Farrell FJ, Jones JD, Pugh DG, Steinberg AG, Ward LE.**

(1965). Hereditary progressive arthro-ophthalmopathy. *Clin proc* 40:433-55.

Suda M, Ogawa Y, Tanaka K, Tamura N, Yasoda A, Takigawa T, Uehira M, Nishimoto H, Itoh H, Saito Y, Shiota K, Nakao K. (1998). Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(5), 2337-42.

Südbeck P, Scherer G. (1997). Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *J Biol Chem* 272(44), 27848-52.

Suzuki S, Yoshimura M, Nakayama M, Mizuno Y, Harada E, Ito T, Nakamura S, Abe K, Yamamuro M, Sakamoto T, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H. (2004). Plasma level of B-type natriuretic peptide as a prognosis marker after acute myocardial infarction: a long-term follow-up analysis. *Circulation* 110: 1387-1391.

Svingen T, Tonissen KF. (2006). Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Hereditary (Edimb)* 97(2):88-96.

Tagariello A, Heller R, Greven A, Kalscheuer VM, Molter T, Rauch A, Kress W, Winterpacht A. (2006). Balanced translocation in a patient with craniosynostosis disrupts the SOX6 gene and an evolutionarily conserved non-transcribed region. *J Med Genet* 43(6), 534-40.

Tompson SW, Merriman B, Funari VA, Fresquet M, Lachman RS, Rimoin DL, Nelson SF, Briggs MD, Cohn DH, Krakow D. (2009). A recessive skeletal dysplasia, SEMD aggrecan type, results from a missense mutation affecting the C-type lectin domain of aggrecan. *Am J Hum Genet* 84(1):72-9.

Tian XX, Rai D, Li J, Zou C, Bai Y, Wazer D, Band V, Gao Q. (2005). BRCA2 suppresses cell proliferation via stabilizing MAGE-D1. *Cancer Res* 65(11), 47-53.

Tiecke E, Bangs F, Blaschke R, Farrell ER, Rappold G, Tickle C. (2006). Expression of the short stature homeobox gene Shox is restricted by proximal and distal signals in chick limb buds and affects the length of skeletal elements. *Dev Biol* 298(2), 585-96.

Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Enomoto-Iwamoto M, Ohmori T, Enomoto H, Nakata K, Takada K, Kurisu K, Komori T. (2001). Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *J Cell Biol* 153(1):87-100.

Varon R, Gooding R, Steglich C, Marns L, Tang H, Angelicheva D, Yong KK, Ambrugger P, Reinhold A, Morar B, Baas F, Kwa M, Tournev I, Guerguelcheva V, Kremensky I, Lochmüller H, Müllner-Eidenböck A, Merlini L, Neumann L, Bürger J, Walter M, Swoboda K, Thomas PK, von Moers A, Risch N, Kalaydjieva L. (2003). Partial deficiency of the C-terminal- domain phosphatase of RNA polymerase II is associated with congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome. *Nat Genet* 35:185-189.

Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G. (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79(6), 1111-20.

- Walker BA, Murdoch JL, Mc Kusick VA, Langer LO, Beals RK.** (1971). Hypochondroplasia. *Am. J. Dis. Child*, 122:95-104.
- Wang J, Zhou J, Bondy CA.** (1999). Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *FASEB J* 13, 1985-1990.
- Wang LQ, Balakir R, Horton WE Jr.** (1991). Identification of a cis-acting sequence in the collagen II enhancer required for chondrocyte expression and the binding of a chondrocyte nuclear factor. *J Biol Chem* 266(30):19878-81.
- Wang LQ, Balakir R, Horton WE Jr.** (2004). Identification of a cis-acting sequence in the collagen II enhancer required for chondrocyte expression and the binding of a chondrocyte nuclear factor. *J Biol Chem* 266(30):19878-81.
- Wallis GA, Rash B, Sykes B, Bonaventure J, Maroteaux P, Zabel B, Wynne-Davies R, Grant ME, Boot-Handford RP.** (1996). Mutations within the gene encoding the alpha 1 (X) chain of type X collagen (COL10A1) cause metaphyseal chondrodysplasia type Schmid but not several other forms of metaphyseal chondrodysplasia. *J Med Genet* 33(6):450-7.
- Wegner M.** (1999). From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 27(6):1409-20.
- Weise M, De-Levi S, Barnes KM, Gafni RI, Abad V, Baron J.** (2001). Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 6871-6876.
- Williams ME, Strickland P, Watanabe K, Hinck L.** (2003). UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE. *J Biol Chem* 278(19), 17483-90.
- Wilson D, Sheng G, Lecuit T, Dostatni N, Desplan C.** (1993). Cooperative dimerization of paired class homeo domains on DNA. *Genes Dev* 7(11), 2120-34.
- Wilson DS, Guenther B, Desplan C, Kuriyan J.** (1995). High resolution crystal structure of a paired (Pax) class cooperative homeodomain dimer on DNA. *Cell* 82(5), 709-19.
- Wissmüller S, Kosian T, Wolf M, Finzsch M, Wegner M.** (2006). The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors. *Nucleic Acids Res* 34(6), 1735-44.
- Wit JM, Kamp GA, Rikken B.** (1996). Spontaneous growth and response to growth hormone treatment in children with growth hormone deficiency and idiopathic short stature. *Pediatr Res* 39, 295-302.
- Wolberger C.** (1996). Homeodomain interactions. *Curr Opin Struct Biol* 6(1), 62-8. Review.
- Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ.** (1996). Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 335, 1363-1367.
- Xue B, Wen C, Shi Y, Zhao D, Li C.** (2005). Human NRAGE disrupts E-cadherin/beta-

catenin regulated homotypic cell-cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 336 (1), 247-51.

Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(13), 7324-9.

Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frystyk J, Boisclair YR, LeRoith D. (2002). Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 110, 771-781.

Yamashita S, Miyaki S, Kato Y, Yokohama S, Sato T, Barrionuevo F, Akiyama H, Scherer G, Takada S, Asahara H. (2012). L-Sox5 and Sox6 enhance chondrogenic miR-140 expression by strengthening dimeric Sox9 activity. *J Biol Chem* 287(26):22206-15.

Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y, Komori T. (2004). Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev* 18, 952-963.

Yu L, Gu S, Alappat S, Song Y, Yan M, Zhang X, Zhang G, Jiang Y, Zhang Z, Zhang Y, Chen Y. (2005). Shox2-deficient mice exhibit a rare type of incomplete clefting of the secondary palate. *Development* 132(19), 4397-406.

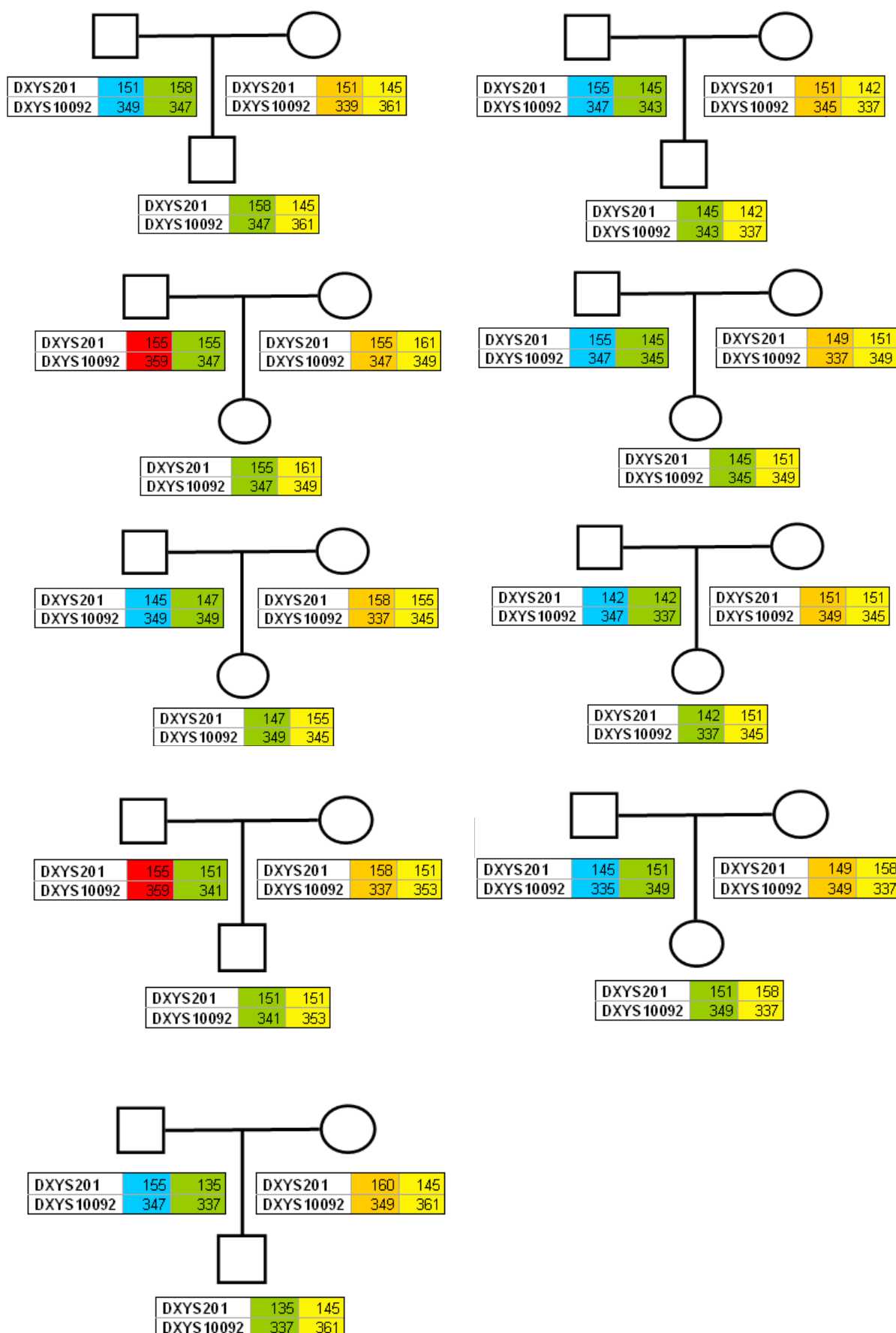
Yu L, Liu H, Yan M, Yang J, Long F, Muneoka K, Chen Y. (2007). Shox2 is required for chondrocyte proliferation and maturation in proximal limb skeleton. *Dev Biol* 306(2), 549-59.

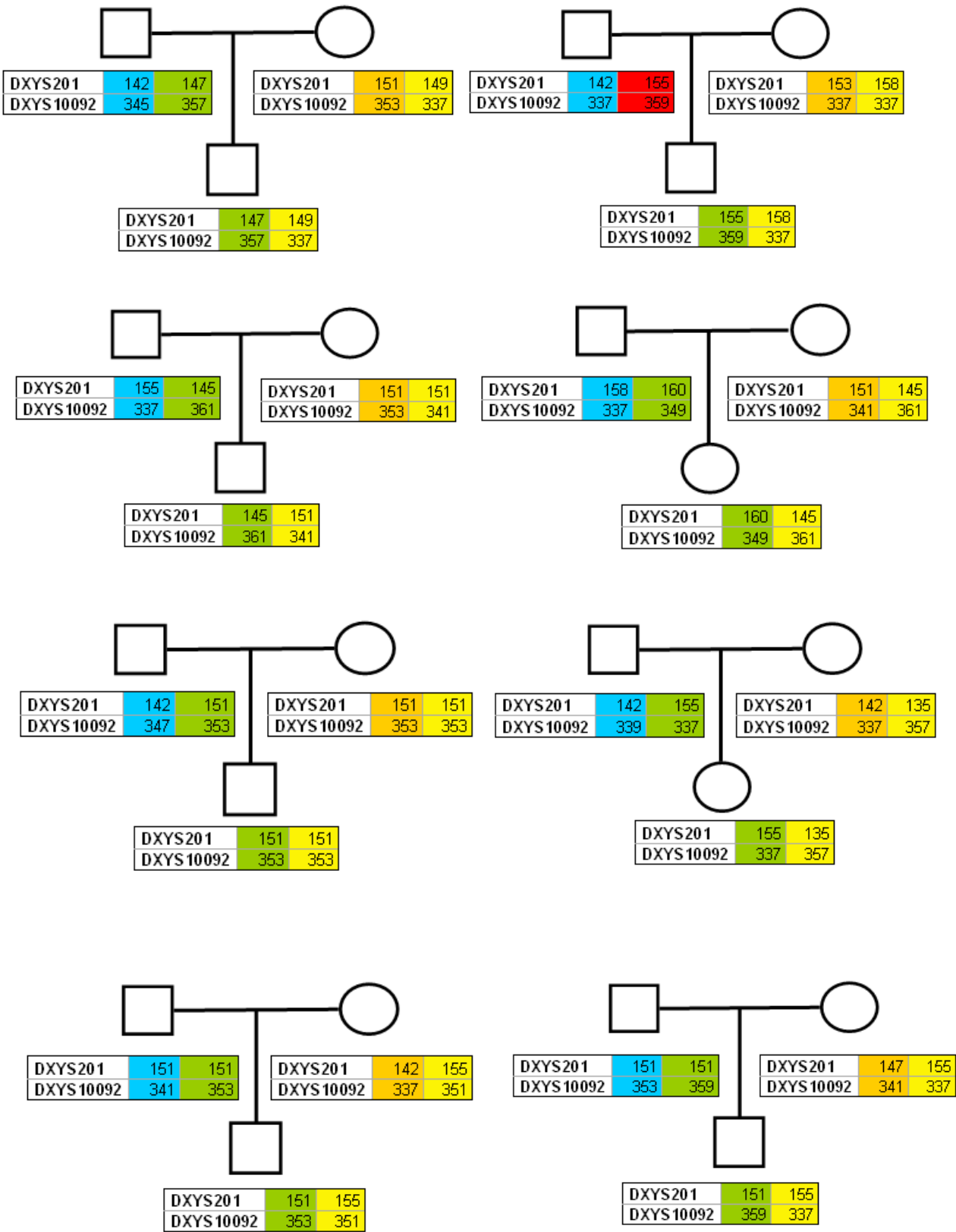
Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, de Crombrughe B. (1997). Parallel expresión of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn* 209, 377-386.

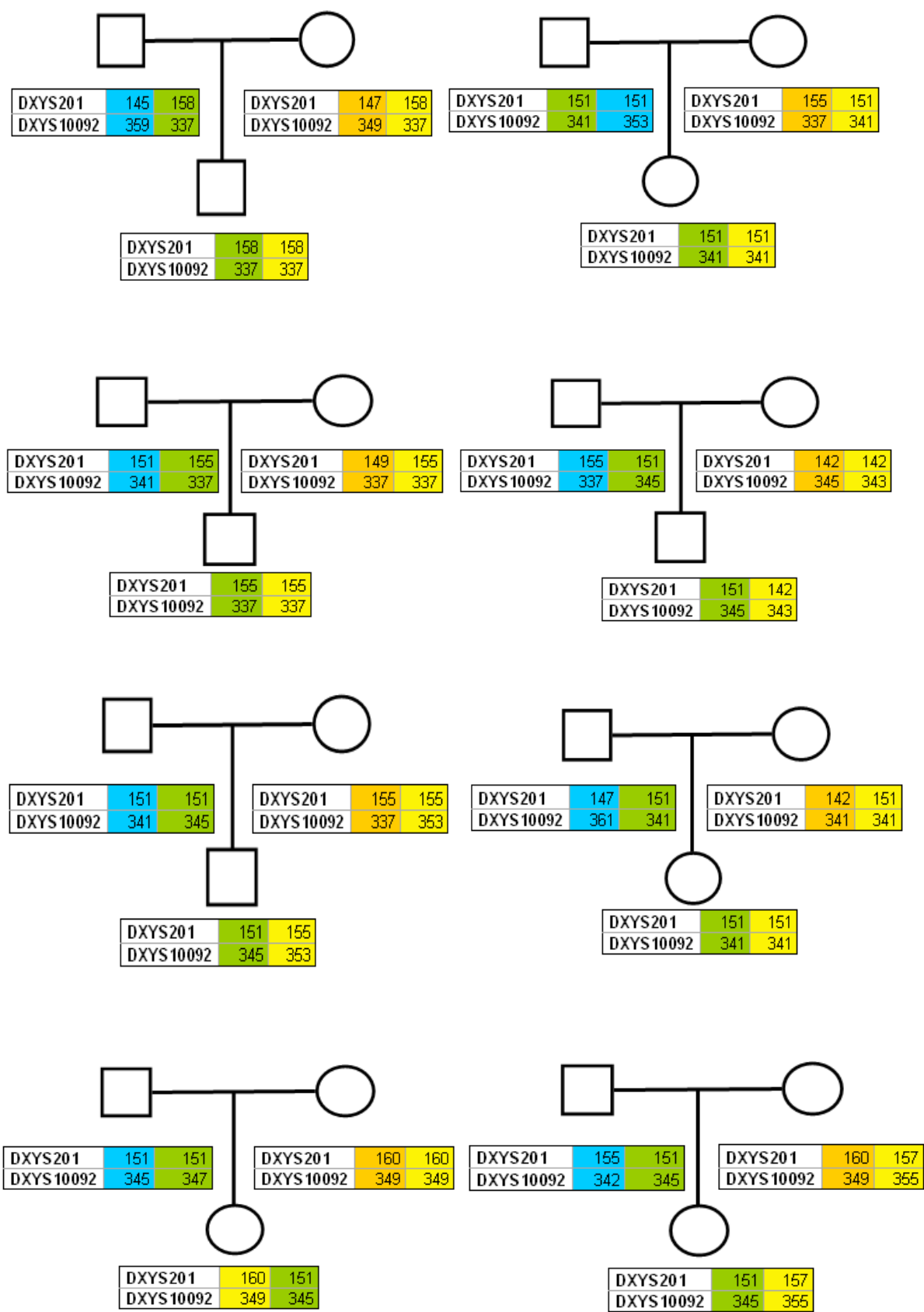
Zung A, Phillip M, Chalew SA, Palese T, Kowarski AA, Zadik Z. (1999). Testosterone effect on growth and growth mediators of the GH-IGF-I axis in the liver and epiphyseal growth plate of juvenile rats. *J Mol Endocrinol* 23(2):209-21.

ANEXO I

Anexo 1. Estudio del haplotipo asociado a la mutación p.A170P en 25 tríos (padres e hijos), procedentes de individuos con diferentes patologías y representativos de un grupo de gitanos búlgaros.







Anexo 1. Determinación de la frecuencia alélicas para cada marcador y para cada individuo

| DXYS201 | | DXYS10092 | |
|---------|------------|-----------|------------|
| alelo | proporción | alelo | proporción |
| 135 | 0,02 | 335 | 0,01 |
| 142 | 0,12 | 337 | 0,26 |
| 145 | 0,1 | 339 | 0,02 |
| 147 | 0,05 | 341 | 0,12 |
| 149 | 0,04 | 343 | 0,02 |
| 151 | 0,31 | 345 | 0,1 |
| 153 | 0,02 | 347 | 0,09 |
| 155 | 0,21 | 349 | 0,13 |
| 158 | 0,09 | 351 | 0,02 |
| 160 | 0,04 | 353 | 0,1 |
| | | 355 | 0,01 |
| | | 357 | 0,02 |
| | | 359 | 0,05 |
| | | 361 | 0,05 |

| Haplotipo asociado a la enfermedad | Frecuencia esperada del haplotipo |
|------------------------------------|------------------------------------|
| 155 359 | 0,0105 |
| | Frecuencia observada del haplotipo |
| | 0,03 |

ANEXO II

Durane el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han obtenido las siguientes publicaciones:

Barca-Tierno V, Aza-Carmona M, Barroso V, Heine-Suner D, Azmanov D, Rosell J, Ezquieta B, Sentchordi Montané L, Vendrell T, Cruz J, Santos F, Rodríguez JI, Pozo J, Argente J, Kalaydjieva L, Gracia R, Campos-Barros A, Benito-Sanz S, Heath KE. (2011). Identification of a Gypsy SHOX mutation (p.A170P) in Léri-Weill dyschondrosteosis and Langer mesomelic dysplasia. *Eur J Human Genet* 1-8.

Aza-Carmona M, Shears DJ, Yuste-Checa P, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, Belinchón A, Benito-Sanz S, Rodríguez JI, Argente J, Campos-Barros A, Scambler PJ, Heath KE. (2011). SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer. *Hum Mol Genet* 20: 1547-1559.

ARTICLE

Identification of a Gypsy SHOX mutation (p.A170P) in Léri-Weill dyschondrosteosis and Langer mesomelic dysplasia

Verónica Barca-Tierno^{1,2}, Miriam Aza-Carmona^{1,2}, Eva Barroso^{1,2}, Damia Heine-Suner³, Dimitar Azmanov⁴, Jordi Rosell³, Begoña Ezquieta^{2,5}, Lucia Sentchordi Montané⁶, Teresa Vendrell⁷, Jaime Cruz⁸, Fernando Santos^{1,2}, José Ignacio Rodríguez⁹, Jesús Pozo^{10,11,12}, Jesús Argente^{10,11,12}, Luba Kalaydjieva⁴, Ricardo Gracia¹³, Ángel Campos-Barros^{1,2}, Sara Benito-Sanz^{1,2,14} and Karen E Heath^{*,1,2,14}

We report the clinical and molecular characteristics of 12 Spanish families with multiple members affected with Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) or Langer mesomelic dysplasia (LMD), who present the *SHOX* (short stature homeobox gene) mutation p.A170P (c.508G>C) in heterozygosity or homozygosity, respectively. In all studied families, the A170P mutation co-segregated with the fully penetrant phenotype of mesomelic limb shortening and Madelung deformity. A shared haplotype around *SHOX* was observed by microsatellite analysis, confirming the presence of a common ancestor, probably of Gypsy origin, as 11 of the families were of this ethnic group. Mutation screening in 359 Eastern-European Gypsies failed to identify any carriers. For the first time, we have shown *SHOX* expression in the human growth plate of a 22-week LMD fetus, homozygous for the A170P mutation. Although the mutant *SHOX* protein was expressed in all zones of the growth plate, the chondrocyte columns in the proliferative zone were disorganized with the chondrocytes occurring in smaller columnal clusters. We have also identified a novel mutation at the same residue, c. 509C>A (p.A170D), in two unrelated Spanish LWD families, which similar to A170P mutation impedes nuclear localization of *SHOX*. In conclusion, we have identified A170P as the first frequent *SHOX* mutation in Gypsy LWD and LMD individuals.

European Journal of Human Genetics advance online publication, 29 June 2011; doi:10.1038/ejhg.2011.128

Keywords: *SHOX*; A170P; A170D; Léri-Weill dyschondrosteosis; Langer mesomelic dysplasia; founder

INTRODUCTION

Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD; MIM 127300) is a dominantly inherited skeletal dysplasia characterized by disproportionate short stature, mesomelic limb shortening and the Madelung deformity: bowing of the radius and distal dislocation of the ulna.¹ Langer mesomelic dysplasia (LMD; MIM 249700) represents a more severe clinical form with disproportionate short stature due to shortening of the mesomelic and rhizomelic limb segments, abnormality of the humeral head, angulation of the radial shaft, carpal distortion, short femoral neck and hypoplastic or absent proximal half of the fibula.²

SHOX (short stature homeobox gene, MIM 312865), localized within the pseudoautosomal region 1 (PAR1) of the X and Y chromosomes^{3,4} encodes a transcription factor implicated in skeletal growth.⁵ *SHOX* haploinsufficiency results in LWD, whereas total deficiency results in LMD.^{6–8} Mutations include deletions of *SHOX*^{9,10} or the downstream enhancer region,^{11–14} partial or complete

SHOX duplications,¹⁵ or point or insertion/deletion mutations within *SHOX*.

The *SHOX* missense mutation p.A170P was originally identified in a large consanguineous Spanish Gypsy LWD/LMD family,¹⁶ and subsequently reported by us in a second Spanish Gypsy family.¹⁷ Alanine 170 is localized within the five amino acids of the homeo-domain, which form the *SHOX* nuclear localization signal.^{16,18} Functional studies showed that the mutant protein was unable to enter the nucleus, thus impairing its function as a transcription factor.¹⁶

During routine analysis of LWD/LMD referrals, we have identified a total of 12 Spanish families presenting with the p.A170P mutation, including the two previously described,^{16,17} and two Spanish families with a previously undescribed mutation at the same residue, p.A170D. Functional analysis of the A170D mutant showed that, similar to A170P, nuclear translocation was impaired. We subsequently

¹Instituto de Genética Médica y Molecular, Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ³Department of Genetics, Hospital Son Espases, Palma de Mallorca, Spain; ⁴Laboratory of Molecular Genetics, Western Australian Institute for Medical Research, UWA Centre for Medical Research, University of Western Australia, Perth, Australia; ⁵Department of Biochemistry, Hospital Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ⁶Department of Pediatrics, Hospital Infanta Leonor, Madrid, Spain; ⁷Department of Genetics, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁸Department of Pediatric Endocrinology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ⁹Department of Pathology, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; ¹⁰Department of Endocrinology, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Instituto de Investigación La Princesa, Madrid, Spain; ¹¹Department of Pediatrics, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; ¹²Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología, Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ¹³Department of Pediatric Endocrinology, Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

*Correspondence: Dr KE Heath, Instituto de Genética Médica y Molecular, Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, Pº Castellana 261, Madrid 28046, Spain. Tel: +34 91 727 7469; Fax: +34 91 207 1040; E-mail: kheath.hulp@salud.madrid.org

¹⁴These authors contributed equally to this work.

Received 9 March 2011; revised 26 May 2011; accepted 1 June 2011

undertook haplotype analysis around *SHOX* in these families to investigate the possibility of common ancestry for each mutation or whether alanine 170 represents a mutation hotspot. A common haplotype around *SHOX* was observed for the 12 families with the A170P mutation suggesting a common ancestor, whereas no haplotype was shared between the two A170D individuals.

We had the opportunity to evaluate *SHOX* expression in the human growth plate of a 22-week LMD fetus, confirmed to be an A170P homozygote. The chondrocytes in the reserve zone appeared enlarged and in pairs, whereas the columns in the proliferative zone were disorganized.

In summary, we report the first founder *SHOX* mutation, A170P, in the Gypsy LWD population and the presence of another mutation at the same residue, A170D, in two LWD families.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

The study was approved by the local ethics committees from the various institutions. Informed consent for the study was provided by all the participants or their legal representatives. Genomic DNA was isolated from whole blood, amniotic fluid or paraffin-embedded tissue using the Blood core B kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), Master Pure DNA purification kit (Epicentre, Illumina, Madison, WI, USA) or QIAamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen), respectively. The pedigrees of the 12 A170P families are shown in Figure 1,

whereas the clinical data is listed in Table 1. The height range of LWD and LMD A170P affected individuals was -1.7 to -5.6 SD and -8.2 to -10.2 SD, respectively. The transabdominal ultrasonographical data and the post-termination radiographs of the LMD fetus (family 11, IV.9) are shown in Supplementary Figure 1.

Three control cohorts were analyzed for the mutation or for the associated haplotype: (1) 88 'healthy unrelated' Spanish Gypsies, (2) 359 Eastern-European Roma individuals: 233 of whom belonged to the Balkan and 126 to the Vlax migrational category and (3) 173 Spanish control subjects with heights within the normal range for the Spanish population for age and gender ($-2 < \text{SDS} < +2$), obtained from the Spanish DNA bank (University of Salamanca, Spain).

Mutation detection

Deletion and duplication analysis was carried out using the commercial *SHOX*/PAR1 MLPA Kit (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands) and in accordance to the manufacturer's recommendations. *SHOX* mutations were screened using various techniques: high-resolution melting analysis (HRM) in a LightScanner HR96 system (Idaho Technologies, Salt Lake City, UT, USA), dHPLC (WAVE 4500HT, Transgenomic, Omaha, MO, USA) and/or DNA sequencing (ABI 3130, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), as previously described.¹⁷

The A170P mutation was screened in the Eastern-European Roma population using HRM on the Lightcycler 480 (Roche Applied Bioscience, Roche, Mannheim, Germany). The PCR conditions were 1× Roche Lightcycler master mix, 3.0 mM MgCl₂, 0.2 μM of each oligonucleotide, 5% DMSO and 10 ng DNA

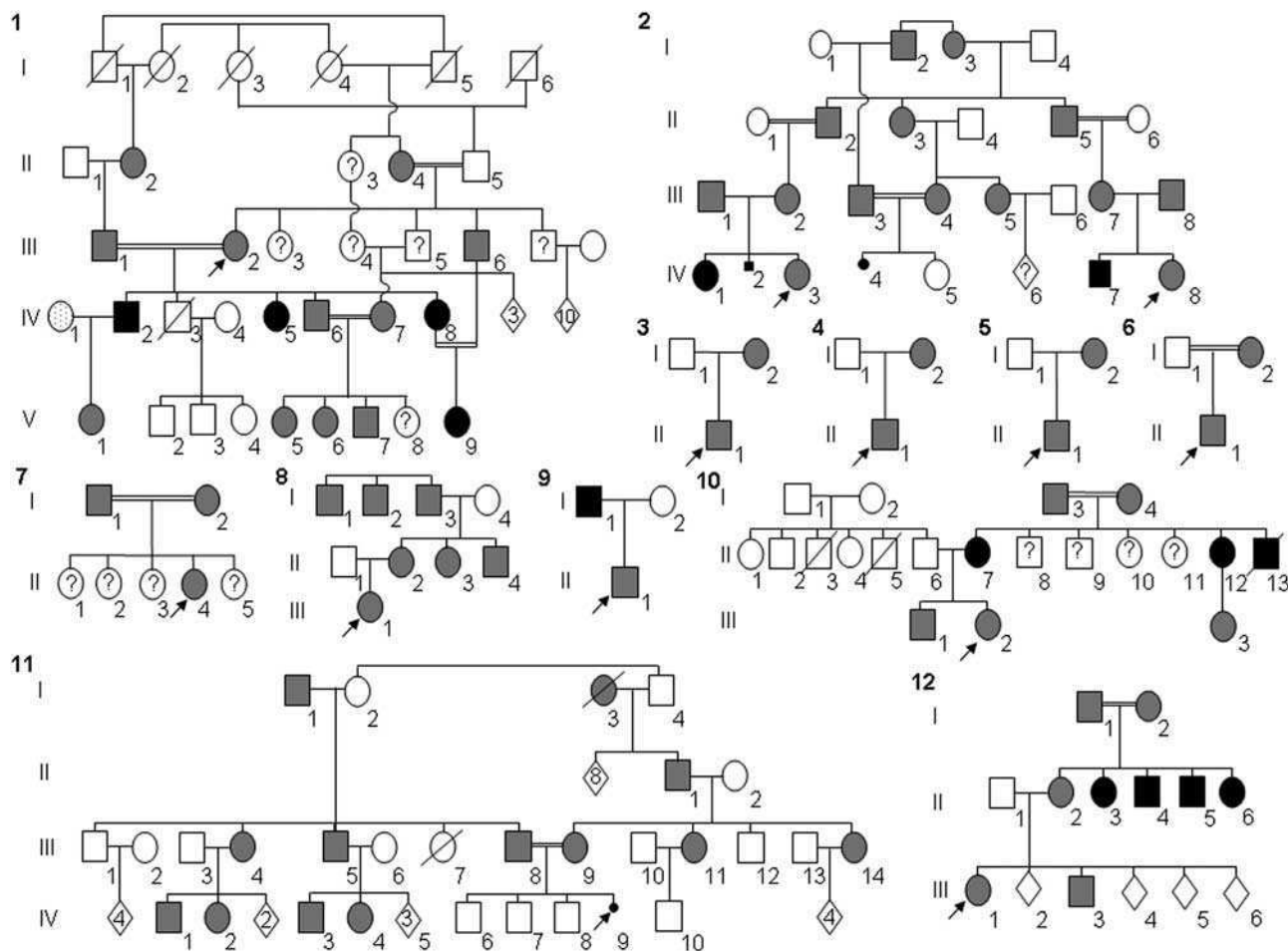


Figure 1 Pedigrees of the 12 LWD/LMD families carrying the A170P *SHOX* mutation. Individuals with LWD are shown as gray filled symbols, whereas individuals with LMD are shown as black filled symbols. Individual IV.1 of family 1 was clinically and genetically diagnosed with achondroplasia (*FGFR3* c.1138G>A, G380R). Unknown diagnosis is shown by a question marker.

Table 1 Clinical details of the documented LWD and LMD affected individuals and the prenatal diagnosis undertaken in the 12 Spanish families

| Family | Ethnic origin | Pedigree individual No. | Sex (F/M) | Status | Gen. Conf. | Age (years) | Height (cm) | Height SDS | MD | Other clinical and auxological details |
|----------------|---------------|-------------------------|-----------|--------|------------|-------------|-------------|------------|----|---|
| 1 | Gypsy | II.4 | F | LWD | — | Adult | 140.0 | −3.7 | MD | — |
| 1 | Gypsy | III.2 | F | LWD | Y | Adult | 140.8 | −3.6 | MD | — |
| 1 | Gypsy | III.6 | M | LWD | — | Adult | 148.0 | −4.5 | MD | — |
| 1 | Gypsy | IV.2 | M | LMD | Y | Adult | SS | — | MD | — |
| 1 | Gypsy | IV.5 | F | LMD | — | Adult | 109.0 | −9.1 | — | — |
| 1 | Gypsy | IV.6 | M | LWD | Y | Adult | SS | — | MD | — |
| 1 | Gypsy | IV.7 | F | LWD | Y | Adult | SS | — | MD | — |
| 1 | Gypsy | IV.8 | F | LMD | — | Adult | 110.0 | −9.0 | — | — |
| 1 | Gypsy | V.1 | F | LWD | Y | Adult | SS | — | MD | — |
| 1 | Gypsy | V.5 | F | LWD | Y | Adult | SS | — | MD | — |
| 1 | Gypsy | V.6 | F | LWD | Y | Adult | SS | — | MD | — |
| 1 | Gypsy | V.7 | M | LWD | Y | 12.0 | 116.6 | −5.1 | MD | — |
| 1 | Gypsy | V.9 | F | LMD | — | 7.0 | 89.0 | −8.0 | — | — |
| 2 | Gypsy | III.1 | M | LWD | Y | Adult | SS | — | MD | — |
| 2 | Gypsy | III.2 | F | LWD | — | Adult | SS | — | MD | — |
| 2 | Gypsy | III.3 | M | LWD | Y | Adult | SS | — | MD | — |
| 2 | Gypsy | III.4 | F | LWD | Y | Adult | SS | — | MD | — |
| 2 | Gypsy | III.5 | F | LWD | Y | Adult | SS | — | MD | — |
| 2 | Gypsy | III.7 | F | LWD | Y | Adult | SS | — | MD | — |
| 2 | Gypsy | III.8 | M | LWD | Y | Adult | SS | — | MD | — |
| 2 | Gypsy | IV.1 | F | LMD | — | Fetus | SS | — | — | — |
| 2 | Gypsy | IV.2 | M | LMD | — | Fetus | NA | NA | NA | Electively aborted at 16 weeks gestation due to severe limb shortening with ultrasonography No genetic analysis undertaken |
| 2 ^a | Gypsy | IV.3 | F | LWD | Y | Fetus | NA | NA | NA | Prenatal diagnosis at 19 weeks gestation |
| 2 ^a | Gypsy | IV.4 | F | LMD | Y | Fetus | NA | NA | NA | Electively aborted after prenatal diagnosis at 18 weeks gestation |
| 2 | Gypsy | IV.5 | F | N | Y | Fetus | NA | NA | NA | Prenatal diagnosis at 16 weeks gestation |
| 2 | Gypsy | IV.6 | ND | ND | ND | Fetus | NA | NA | NA | No prenatal diagnosis undertaken as risk of LWD but not LMD |
| 2 | Gypsy | IV.7 | M | LMD | — | Child | SS | — | — | — |
| 2 ^a | Gypsy | IV.8 | F | LWD | Y | Fetus | NA | NA | NA | Prenatal diagnosis at 19 weeks gestation |
| 3 | Gypsy | I.2 | F | LWD | Y | Adult | SS | — | MD | — |
| 3 | Gypsy | II.1 | M | LWD | Y | 10.0 | SS | — | MD | — |
| 4 | Spanish | I.2 | F | LWD | Y | Adult | 142.5 | −3.3 | MD | — |
| 4 | Spanish | II.1 | M | LWD | Y | 3.5 | 88.5 | −2.7 | MD | — |
| 5 | Gypsy | I.2 | F | LWD | Y | Adult | 143.0 | −3.2 | MD | — |
| 5 | Gypsy | II.1 | M | LWD | Y | 14.4 | 145.0 | −2.4 | MD | — |
| 6 | Gypsy | I.2 | F | LWD | Y | Adult | 146.1 | −2.6 | MD | Cervical scoliosis |
| 6 | Gypsy | II.1 | M | LWD | Y | 13.4 | 134.1 | −2.8 | MD | Cervical scoliosis |
| 7 | Gypsy | II.4 | F | LWD | Y | 11.8 | 113.0 | −5.6 | MD | Cervical scoliosis |
| 8 | Gypsy | II.2 | F | LWD | Y | Adult | 135.0 | −4.6 | MD | — |
| 8 | Gypsy | III.1 | F | LWD | Y | 6.5 | 99.5 | −3.7 | MD | — |
| 9 | Gypsy | I.1 | M | LMD | — | Adult | 120 | −8.2 | MD | — |
| 9 | Gypsy | II.1 | F | LWD | Y | Child | SS | — | MD | — |
| 10 | Gypsy | II.7 | F | LMD | Y | Adult | 101.0 | −10.2 | MD | — |
| 10 | Gypsy | III.1 | F | LWD | Y | 8.5 | SS | — | MD | — |
| 11 | Gypsy | I.1 | M | LWD | — | Adult | SS | — | MD | — |
| 11 | Gypsy | I.3 | F | LWD | — | Adult | SS | — | MD | — |
| 11 | Gypsy | I.9 | M | LWD | — | Adult | 143.0 | −3.7 | MD | — |
| 11 | Gypsy | III.4 | F | LWD | — | Adult | 145.0 | −3.3 | MD | — |
| 11 | Gypsy | III.5 | M | LWD | — | Adult | 155.0 | −3.6 | MD | — |
| 11 | Gypsy | III.8 | M | LWD | Y | Adult | 152.0 | −4.1 | MD | — |
| 11 | Gypsy | III.9 | F | LWD | Y | Adult | 144.0 | −3.5 | MD | — |
| 11 | Gypsy | III.11 | F | LWD | — | Adult | 140.0 | −4.2 | MD | — |
| 11 | Gypsy | III.14 | F | LWD | — | Adult | 147.0 | −3.0 | MD | — |
| 11 | Gypsy | IV.1 | M | LWD | — | ND | SS | — | ND | — |
| 11 | Gypsy | IV.2 | F | LWD | — | ND | SS | — | ND | — |
| 11 | Gypsy | IV.3 | M | LWD | — | ND | SS | — | ND | — |
| 11 | Gypsy | IV.4 | F | LWD | — | ND | SS | — | ND | — |

Table 1 (Continued)

| Family | Ethnic origin | Pedigree individual No. | Sex (F/M) | Status | Gen. Conf. | Age (years) | Height (cm) | Height SDS | MD | Other clinical and auxological details |
|-----------------|---------------|-------------------------|-----------|--------|------------|-------------|-------------|----------------|----|--|
| 11 ^b | Gypsy | IV.9 | M | LMD | Y | Fetus | SS | — ^a | MD | Electively aborted at 22 weeks gestation after prenatal diagnosis. Body length 25 cm, humerus 30 mm, radius 19 mm, ulna 9 mm, femur 32 mm, tibia 25 mm, fibia 11 mm (Supplementary Figure 1) |
| 12 | Gypsy | II.2 | F | LWD | Y | Adult | 142.0 | −3.4 | MD | — |
| 12 | Gypsy | III.1 | F | LWD | Y | 9.6 | 127.0 | −1.7 | MD | — |

Abbreviations: LMD, Langer mesomelic dysplasia; LWD, Léri-Weill dyschondrosteosis; MD, Madelung deformity; N, normal; NA, no measurements could be undertaken as the individual was a fetus; ND, not determined; SS, short stature.

^aPrenatal analysis undertaken with amniocentesis material.

^bAnalysis undertaken using DNA extracted from aborted tissue.

Status: LWD and LMD=A170P mutation in heterozygosity and homozygosity, respectively.

in a total volume of 15 μ l. The sense and antisense oligos were 5'-CT TGGTTCAGCCTCATGGGAAG-3' and 5'-TGTGGTGGTCTGGGTGTAGC C-3', respectively. The PCR cycling and HRM conditions were according to the manufacturer's recommendations (Roche Applied Bioscience).

Haplotype analysis

Haplotype analysis was undertaken to determine if a common ancestor was present for the two different mutations. Eight microsatellite markers located intragenically or in the 5' and 3' flanking regions of *SHOX* were analyzed as previously described.^{11,17,19} The probability of observing the associated haplotype in the Spanish Gypsy and control populations was determined by analyzing the genotypes for each microsatellite marker in at least 100 chromosomes of the respective populations.

Subcellular localization studies

The A170D and A170P mutations were introduced into the vector pFLAG-CMV-1 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) containing the full-length *SHOXa* cDNA using primers 5'-TCCAGAACCGGAGACCCAAGTGCCGCAAAC-3' and 5'-GGTTCAGAACCGGAGACCCAAGTGCCGCAAACAAG-3', respectively, and the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations.

Immunocytochemistry: U2OS human osteosarcoma cells (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) were grown in Dulbecco's modified Eagles medium supplemented with antibiotics and 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Life Technologies) for 24 h on four-well chamber slides (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Transient transfection of the different plasmid constructs was undertaken using FuGene (Roche Applied Bioscience) according to the manufacturer's instructions. At 24 h post transfection, the cells were washed and fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich). Briefly, the cells were then washed with PBS and blocked with glycine buffer (1% BSA, 0.3 M glycine, Tween 0.2% diluted in PBS (PBS-T)). The preparations were incubated overnight at 4°C with a rabbit polyclonal SHOX antibody.²⁰ The cells were then washed with PBS-T and incubated with the secondary antibody, Alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Commercial Molecular Probes, Invitrogen). The cells were subsequently washed again with PBS-T, counterstained with DAPI (Sigma-Aldrich) and mounted with Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich). SHOX and DAPI localization were visualized using a confocal microscope SP5 (Leica, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

Immunohistochemistry: Human radius and ulna growth plate sections were obtained from an electively aborted 22-week LMD fetus, confirmed to be an A170P homozygote by prenatal analysis (family 11, individual IV.9) and a spontaneously aborted 'healthy' 23-week fetus. Parents had provided informed consent for the use of their fetus for scientific research relevant to the clinical diagnosis. The LMD fetus was confirmed to carry two copies of the A170P mutation. Subsequently, histological analysis was undertaken as previously described.²⁰ Controls for specific antibody staining were performed by (1) using preimmune serum from the rabbit immunized against the SHOX peptide, at a dilution of 1:1000; (2) replacing the primary antibody with PBS; (3) using a rabbit polyclonal IgG isotype control (Ab27472, Abcam, Cambridge, UK) at a dilution of 1:50 and (4) staining sections of a normal

adult colon with the SHOX antibody. Sections were examined using a DM5500B fluorescent microscope (Leica), and photos were taken using a DFC360FX digital camera (Leica) and visualized using the LA software (Leica).

RESULTS

Mutation detection and haplotype analysis

The *SHOX* mutation p. A170P (c.508G>C) was identified in 12 LWD/LMD probands (Figure 1). In the 12 families, a total of 34 LWD and four LMD individuals were subsequently genetically analyzed, all of whom were heterozygous or homozygous for the mutation, respectively.

The analysis of *SHOX* intragenic and flanking microsatellite markers revealed a common haplotype, present in one or two copies in all LWD and LMD affected family members, respectively. The haplotype block extended at least 77 kb, from microsatellite marker DXYS10038 to DXYS10093, to a maximum length of 165 kb (Table 2). Multiple haplotypes were observed with increasing physical distance from *SHOX*, suggesting the occurrence of multiple recombination events (Table 2). The frequency of this haplotype was determined in two control cohorts; 1 in 40 062 in Spanish Gypsies and 1 in 390 000 Spanish normal height controls.

As the A170P mutation was identified in 11 Spanish Gypsy families, we investigated its history. We looked into the genealogy of each family by last names and family interviews. Interestingly, the data obtained from one of the homozygous Gypsy probands (family 10) suggested that her family had migrated to Spain several generations ago from Eastern Europe. The common haplotype was observed in this family in the affected LWD and LMD individuals. Subsequently, we screened a panel of population controls from Bulgaria, representing Gypsy groups that remained in the Balkans during the early Gypsy diaspora across Europe. No A170P mutation was identified.

In two additional Spanish non-Gypsy families, we identified a novel missense mutation at the same residue, A170D (c.509C>A). No common *SHOX* haplotype was identified (data not shown).

Subcellular localization

We introduced the A170P and A170D missense mutations into the full-length *SHOX* cDNA by site-directed mutagenesis. The wild-type and mutant plasmids were transiently transfected into U2OS osteosarcoma cells, and the subcellular localization of the different SHOX proteins was analyzed by immunocytochemistry. Both A170D and A170P mutant proteins failed to localize to the nucleus, showing that nuclear translocation was impaired (Figure 2).

SHOX expression in a LMD human growth plate

We compared the expression of mutant SHOX in the human growth plate of a 22-week old fetus, molecularly confirmed to be homozygous

Table 2 Haplotypes determined from *SHOX* intragenic or flanking microsatellite markers in the 12 LWD/LMD families

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Family | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| Member | III.2 | III.6 | IV.1 | IV.2 | IV.6 | IV.7 | V.1 | V.5 | V.6 | V.7 | III.1 | III.2 | III.3 |
| Status | LWD | LWD | ACH | LMD | LWD | LWD | LWD | LWD | LWD | LWD | LWD | LWD | LWD |
| DXYS10037 | 180–180 | 180–180 | 200–180 | 180–180 | 180–180 | 200–180 | 180–180 | 180–180 | 180–200 | 180–180 | 180–198 | 180–200 | 200–180 |
| DXYS10038 | 217– 217 | 217– 217 | 209–213 | 217–217 | 217– 217 | 217– 217 | 213– 217 | 217– 217 | 217–217 | 217– 217 | 217–217 | 217–213 | 209– 217 |
| DXYS201 | 135– 155 | 135– 155 | 145–155 | 155–155 | 135– 155 | 157– 155 | 155– 155 | 135– 155 | 155–157 | 135– 155 | 155–135 | 155–147 | 141– 155 |
| DXYS10092 | 357– 359 | 357– 359 | 363–363 | 359–359 | 357– 359 | 347– 359 | 363– 359 | 357– 359 | 359–347 | 357– 359 | 359–345 | 359–361 | 341– 359 |
| DYS290 | 292– 292 | 292– 292 | 306–296 | 292–292 | 292– 292 | 296– 292 | 296– 292 | 292– 292 | 292–296 | 292– 292 | 292–292 | 292–292 | 294– 292 |
| DXYS10093 | 249– 235 | 247– 235 | 253–247 | 235–235 | 247– 235 | 235– 235 | 247– 235 | 247– 235 | 235–235 | 247– 235 | 235–251 | 235–245 | 251– 235 |
| DXYS10083 | 156–160 | 156–160 | 170–160 | 160–160 | 156–160 | 154–160 | 160–160 | 156–160 | 160–154 | 156–160 | 160–172 | 160–154 | 160–162 |
| DXYS10085 | 218–224 | 218–224 | 226–210 | 224–224 | 218–224 | 222–224 | 210–224 | 218–224 | 224–222 | 218–224 | 216–224 | 216–220 | 216–222 |
| Family | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| Member | III.4 | III.5 | III.6 | III.7 | III.8 | IV.3 | IV.4 | IV.5 | IV.8 | I.2 | II.1 | I.2 | II.1 |
| Status | LWD | LWD | N | LWD | LWD | LWD | LMD | N | LWD | LWD | LWD | LWD | LWD |
| DXYS10037 | 200–180 | 200–180 | 196~200 | 200–180 | 180–200 | 198–180 | 180–180 | 200–200 | 180–200 | 200–180 | 202–180 | 202–180 | 202–180 |
| DXYS10038 | 209– 217 | 209– 217 | 197~197 | 217–197 | 209– 217 | 217– 217 | 217–217 | 209–209 | 197– 217 | 209– 217 | 213– 217 | 209– 217 | 209– 217 |
| DXYS201 | 143– 155 | 143– 155 | 149~155 | 155–151 | 159– 155 | 135– 155 | 155–155 | 151–143 | 151~ 155 | 143– 155 | 151– 155 | 143– 155 | 143– 155 |
| DXYS10092 | 341– 359 | 341– 359 | 347~355 | 359–343 | 349– 359 | 345– 359 | 359–359 | 341–341 | 343– 359 | 359– 359 | 343– 359 | 347– 359 | 347– 359 |
| DYS290 | 306– 292 | 306– 292 | 296~306 | 292–306 | 292– 292 | 292– 292 | 292–292 | 294–306 | 306– 292 | 296– 292 | 296– 292 | 296– 292 | 296– 292 |
| DXYS10093 | 245– 235 | 245– 235 | 235~255 | 235–245 | 249– 235 | 251– 235 | 235–235 | 251–245 | 245– 235 | 243– 235 | 235– 235 | 261– 235 | 261– 235 |
| DXYS10083 | 160–160 | 160–160 | 160~162 | 160–160 | 170–160 | 172–160 | 162–160 | 162–160 | 160–160 | 158–160 | 154–160 | 158–160 | 154–160 |
| DXYS10085 | 214–216 | 214–216 | 220~222 | 216–214 | 216–212 | 224–216 | 222–216 | 222–214 | 214–212 | 218–214 | 224–214 | 218–214 | 224–214 |
| Family | 5 | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 | 7 | 8 | 8 | 8 | 9 | 10 | 10 |
| Member | I.1 | I.2 | II.1 | I.1 | I.2 | II.1 | II.4 | II.1 | II.2 | III.1 | II.1 | II.6 | II.7 |
| Status | N | LWD | LWD | N | LWD | LWD | LWD | N | LWD | LWD | LWD | N | LMD |
| DXYS10037 | 200–192 | 200–180 | 192–180 | 194–200 | 198–180 | 200–180 | 180–180 | 198–200 | 180–190 | 200–180 | 180–198 | 198–192 | 180–180 |
| DXYS10038 | 209–213 | 209– 217 | 213– 217 | 209–209 | 199– 217 | 209– 217 | 217– 217 | 213–217 | 217–217 | 217– 217 | 213– 217 | 197–217 | 217–217 |
| DXYS201 | 143–149 | 143– 155 | 149– 155 | 143–159 | 149– 155 | 159– 155 | 143– 155 | 145–151 | 155–145 | 151– 155 | 147– 155 | 135–145 | 155–155 |
| DXYS10092 | 355–343 | 355– 359 | 343– 359 | 347–349 | 349– 359 | 349– 359 | 339– 359 | 361–353 | 359–361 | 353– 359 | 361– 359 | 317–361 | 359–359 |
| DYS290 | 296–296 | 296– 292 | 296– 292 | 292–296 | 296– 292 | 296– 292 | 296– 292 | 296–292 | 292–306 | 292– 292 | 292– 292 | 292–306 | 292–292 |
| DXYS10093 | 235–235 | 235– 235 | 235– 235 | 233–233 | 247– 235 | 233– 235 | 253– 235 | 235–231 | 235–257 | 231– 235 | 245– 235 | 235–257 | 235–235 |
| DXYS10083 | 162–154 | 154–160 | 154–160 | 154–154 | 156–160 | 154–160 | 162–160 | 156–158 | 162–160 | 158–160 | 164–160 | 160–162 | 160–160 |
| DXYS10085 | 216–224 | 216–214 | 224–214 | 220–224 | 222–214 | 224–214 | 216–214 | 224–228 | 216–212 | 228–216 | 224–216 | 222–212 | 224–224 |
| Family | 10 | 11 | 11 | 11 | 12 | 12 | 12 | | | | | | |
| Member | III.2 | III.8 | IV.9 | III.9 | II.1 | II.2 | III.1 | | | | | | |
| Status | LWD | LWD | LMD | LWD | N | LWD | LWD | | | | | | |
| DXYS10037 | 192–180 | 180–180 | 180–180 | 202–180 | 202–180 | 196–180 | 180–180 | | | | | | |
| DXYS10038 | 217– 217 | 209– 217 | 217–217 | 209– 217 | 209–217 | 213– 217 | 217– 217 | | | | | | |
| DXYS201 | 145– 155 | 145– 155 | 155–155 | 143– 155 | 151–137 | 145– 155 | 137– 155 | | | | | | |
| DXYS10092 | 361– 359 | 387– 359 | 359–359 | 345– 359 | 353–357 | 357– 359 | 357– 359 | | | | | | |
| DYS290 | 306– 292 | 296– 292 | 292–292 | 308– 292 | 292–296 | 292– 292 | 296– 292 | | | | | | |
| DXYS10093 | 257– 235 | 243– 235 | 235–235 | 243– 235 | 251–233 | 251– 235 | 233– 235 | | | | | | |
| DXYS10083 | 162–160 | 164–154 | 154–160 | 154–160 | 158–158 | 160–160 | 158–160 | | | | | | |
| DXYS10085 | 212–224 | 228–224 | 224–220 | 224–220 | 222–216 | 220–216 | 216–216 | | | | | | |

Abbreviations: LMD, Langer mesomelic dysplasia; LWD, Léri-Weill dyschondrosteosis; *SHOX*, short stature homeobox gene; ~, haplotype could not be definitely defined but is predicted to be as stated.
The *SHOX* A170P mutation is located between markers DXYS10092 and DYS290. The common haplotype segregating with the mutation and phenotype is indicated in bold. The precise haplotype associated with the *SHOX* mutation was determined in 10 of the families, whereas a predicted haplotype was determined in families 7 and 10, as DNA was only available from the proband.

for the A170P mutation, with that of a 23-week normal fetal growth plate (Figure 3). *SHOX* was observed in the resting, proliferative and hypertrophic zones of both the control and the LMD growth plate. The chondrocytes appeared to be enlarged and in pairs in the reserve zone of the LMD growth plate. Their columnar stacking in the proliferative zone was also disorganized, with the chondrocytes appearing in less defined columns and in smaller clusters. The controls for antibody-specific staining are shown in Supplementary Figure 2.

DISCUSSION

A total of 12 families with multiple affected LWD and LMD individuals were found to carry the A170P *SHOX* mutation in heterozygosity and homozygosity, respectively. A common haplotype around

SHOX was observed in all 12 families, suggesting the presence of a common ancestor. The probands originate from different Spanish provinces, 11 were of gypsy origin, thus suggesting that the common ancestor belonged to this ethnic group. The probability of this *SHOX* haplotype in the unaffected Spanish Gypsy population was low and even lower in the Spanish population. The haplotype block spanned between 77 and 165 kb. Multiple recombination events had occurred at increased distances. A study of linkage disequilibrium around *SHOX* showed that in Northern-European populations, disequilibrium decays rapidly with physical distance and that the recombination rate of the PAR1 is approximately 20-fold higher than the genome average.²¹ Therefore, it is not unexpected to observe multiple recombinational events in these families.

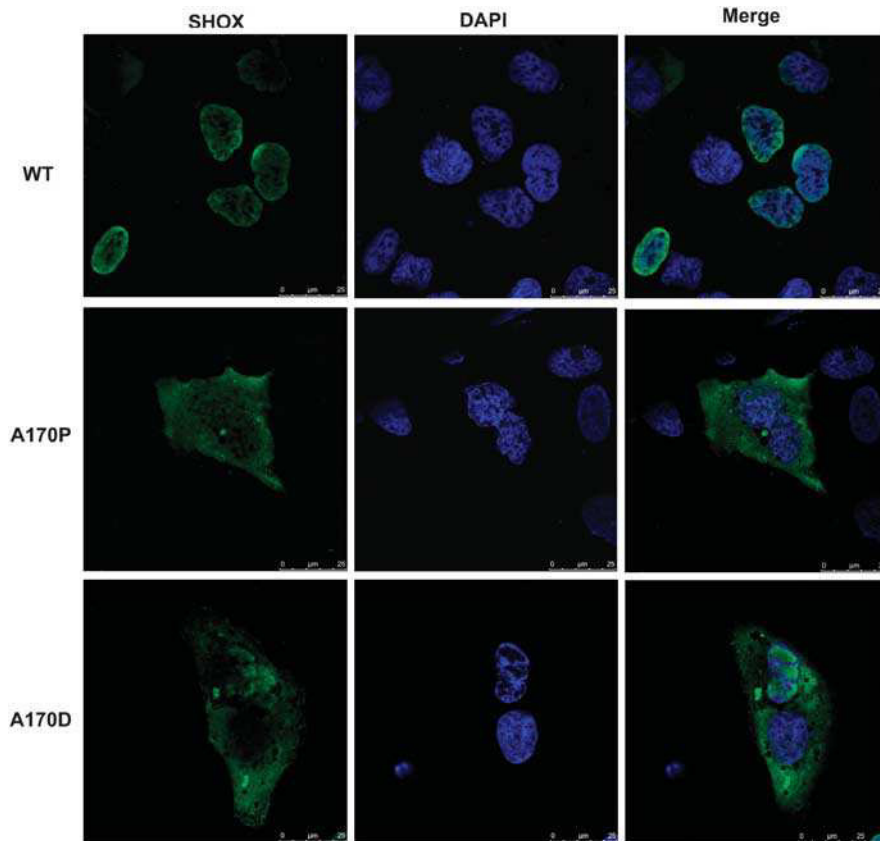


Figure 2 Subcellular localization studies of wild-type and mutant A170P and A170D SHOX proteins. U2OS cells were transiently transfected with the SHOX wild-type and mutant constructs. SHOX expression was detected using a rabbit polyclonal SHOX antibody and the nuclei were counterstained with DAPI. Images were observed using a confocal microscope at $\times 20$ magnification.

As the A170P mutation was identified in 11 Spanish Gypsy families, we investigated its history and incidence of this mutation in the European Gypsy population. A panel of population controls from Bulgaria, representing Gypsy groups that remained in the Balkans during the early Gypsy diaspora across Europe, was screened for the A170P mutation. No mutation was identified, but failure to identify any mutation carrier does not rule out its presence in the Eastern Europe, where it could be confined to specific sub-isolate(s) not represented in the panel or could occur at very low frequency. The A170P SHOX mutation should therefore be the first choice in diagnostic analyses of LWD/LMD patients from this ethnic group. The mutation is more prevalent in the Spanish Gypsy population, in which six out of the seven prenatal diagnoses that we have undertaken in recent years belonged to high-risk Gypsy families.

Interestingly, the A170P mutation was highly penetrant, with all carriers presenting with mesomelic shortening of the limbs and the Madelung deformity, characteristics of LWD, in contrast to other SHOX mutations, which may present as either LWD or idiopathic short stature (ISS, MIM 300582). Only one individual did not fulfill the criteria of short stature (family 12, individual III.1). The high penetrance is likely to be due to the functional importance of alanine 170, which resides within a five non-classic basic amino acid nuclear localization signal (AKCRK), located in the homeodomain of SHOX.^{16,18} Alanine 170 is one of the four amino acids which are invariably conserved in the homeodomain of all paired related homeodomain proteins. The A170P mutation has been shown to result in the incorrect subcellular localization of the SHOX protein, affecting

the translocation from the cytosol to the nucleus, which would lead to the functional impairment of the transcription factor.¹⁶ Indeed, these amino acids have been shown to not only be essential for SHOX nuclear localization, but may also participate in other processes such as DNA binding, dimerization²² and interaction with its cofactors.²⁰

We have investigated, for the first time, the effects of the A170P mutation on the growth plate of the radius and ulna of a LMD fetus. The chondrocytes in the reserve zone appeared enlarged and in pairs, whereas the proliferative zone was disorganized, with the columns appearing shortened and stacked side by side rather than in an orderly stacking. Despite this, the pattern of SHOX expression was unchanged between the normal growth plate and that of the LMD fetus. The histology of the growth plate in LMD fetuses has been previously described,²³ but at this time point, the implicated gene had not been discovered. Later, comparison of the histology and SHOX expression in the growth plate of normal and four LWD fetuses, two with SHOX deletions, one with a splice site mutation and one with a deletion of the SHOX enhancer region was studied.²⁴ In all cases of LWD and LMD, disorganization of the chondrocyte columnar stacking has been observed.

We have also identified two independent LWD probands with a previously unreported mutation (c.509C>A) affecting the same amino acid, p.A170D. We expressed the mutant protein in U2OS osteosarcoma cells and showed that the A170D mutant protein, as shown with the A170P mutation, failed to translocate to the nucleus, thus leading to the malfunction of the transcription factor.

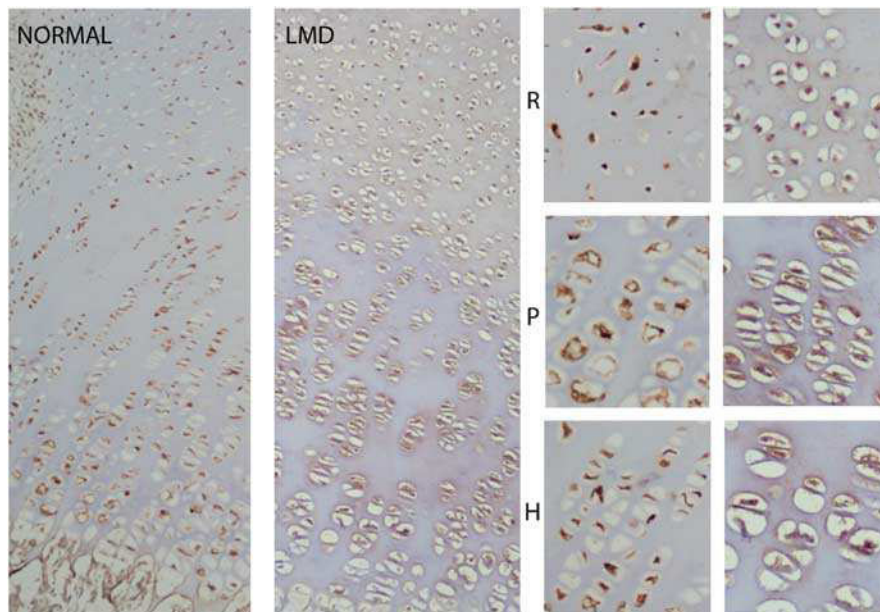


Figure 3 SHOX expression in the human fetal growth plate. Immunohistochemistry performed on the radius and ulna of a 22-week old LMD fetus homozygous for the A170P mutation (family 11, IV.9) and a 23-week old normal fetus. DAB immunostaining ($\times 10$ magnification) performed with anti-SHOX antibody in the LMD and normal fetal growth plate, showing the reserve (R), proliferative (P) and hypertrophic (H) zones. Specific staining can be observed in all zones of the LMD and control growth plates. The chondrocytes appear enlarged and in pairs in the reserve zone of the LMD growth plate. The chondrocyte columnar stacking in the proliferative zone of the LMD preparations is slightly disorganized compared to the normal growth plate. Controls for antibody specificity are shown in Supplementary Figure 2.

Including the cases reported in this study and identified by our group, six different mutations within the five amino acids of the SHOX nuclear localization signal have now been reported in 28 LWD/LMD/ISS probands (unpublished data and SHOX database: http://hyg-serv-01.hyg.uni-heidelberg.de/lov/index.php?select_db=SHOX). Five additional mutations affecting the adjacent amino acids arginine 168 and 169 have been reported in 14 further LWD/ISS cases. Although it has been experimentally shown that these two amino acids are not included within the minimal nuclear localization signal, it has been postulated that they may support the minimal signal by their basicity.¹⁸ Thus, the nuclear localization signal and adjacent basic amino acids appear to be a frequently mutated region associated with LWD and ISS. A note of caution must be mentioned in the detection of mutations in the nuclear localization signal, as both the A170P and A170D mutations result in a false positive deletion of SHOX exon 4 using the commercial MLPA assay.

In conclusion, we have identified A170P as the first common SHOX mutation in Spanish LWD individuals, which appears to have arisen from a common ancestor, most likely of Gypsy origin. Thus, it is advisable to screen the A170P mutation as a first step in the genetic screening cascade of SHOX/PAR1 alterations in Spanish gypsies with LWD or LMD. Moreover, we have also identified a novel mutation, A170D, altering the same conserved alanine 170 residue, which also impairs the nuclear localization of the protein.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Noelia Sanchez for her technical help, Charo De Pablo Diaz for donating the Spanish gypsy controls and to all the clinicians involved with these families. This work was supported by grants from the 'Ministerio de Ciencia e

Innovación' (MICINN, SAF2006-00663 and SAF2009-08230). VB-T was supported by a FPI Ph.D fellowship from the MICINN (SAF2006-00663), SB-S by a CIBERER postdoctoral fellowship and MA-C by a postdoctoral fellowship from MICINN (SAF2006-00663).

- 1 Leri A, Weill J: Une affection congenitale et symetrique du developpement osseux: la dyschondrosteose. *Bull Mem Soc Med Hosp* 1929; **35**: 1491–1494.
- 2 Langer Jr LO: Mesomelic dwarfism of the hypoplastic ulna, fibula, mandible type. *Radiology* 1967; **89**: 654–660.
- 3 Rao E, Weiss B, Fukami M *et al*: Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 1997; **16**: 54–63.
- 4 Ellison JW, Wardak Z, Young MF, Gehron Robey P, Laig-Webster M, Chiong W: PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 1341–1347.
- 5 Rao E, Blaschke RJ, Marchini A, Niesler B, Burnett M, Rappold GA: The Léri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 3083–3091.
- 6 Shears DJ, Guillen-Navarro E, Sempere-Mirallès M *et al*: Pseudodominant inheritance of Langer mesomelic dysplasia caused by a SHOX homeobox missense mutation. *Am J Med Genet* 2002; **110**: 153–157.
- 7 Campos-Barros A, Benito-Sanz S, Ross JL, Zinn AR, Heath KE: Compound heterozygosity of SHOX-encompassing and downstream PAR1 deletions results in Langer mesomelic dysplasia (LMD). *Am J Med Genet Part A* 2007; **143**: 933–938.
- 8 Bertorelli R, Capone L, Ambrosetti F *et al*: The homozygous deletion of the 3' enhancer of the SHOX gene causes Langer mesomelic dysplasia. *Clin Genet* 2007; **72**: 490–491.
- 9 Belin V, Cusin V, Viot G *et al*: SHOX mutations in dyschondrosteosis (Léri-Weill syndrome). *Nat Genet* 1998; **19**: 67–69.
- 10 Shears DJ, Vassal HJ, Goodman FR *et al*: Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Léri-Weill dyschondrosteosis. *Nat Genet* 1998; **19**: 70–73.
- 11 Benito-Sanz S, Thomas NS, Huber C *et al*: A novel class of pseudoautosomal region 1 (PAR1) deletions downstream of SHOX is associated with Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD). *Am J Hum Genet* 2005; **77**: 533–544.
- 12 Fukami M, Okuyama T, Yamamori S, Nishimura G, Ogata T: Microdeletion in the SHOX 3' region associated with skeletal phenotypes of Langer mesomelic dysplasia in a 45,X/46,X,r(X) infant and Léri-Weill dyschondrosteosis in her 46,XX mother: implication for the SHOX enhancer. *Am J Med Genet Part A* 2005; **137**: 72–76.

- 13 Sabherwal N, Bangs F, Roth R *et al*: Long-range conserved non-coding *SHOX* sequences regulated expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. *Hum Mol Genet* 2007; **16**: 210–222.
- 14 Chen J, Wildhardt G, Zhong Z *et al*: Enhancer deletions of the *SHOX* gene as a frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J Med Genet* 2009; **46**: 834–839.
- 15 Benito-Sanz S, Barroso E, Heine-Suñer D *et al*: Clinical and molecular evaluation of *SHOX*/PAR1 duplications in Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and idiopathic short stature (ISS). *J Clin Endocrinol Metab* 2011; **96**: E404–E412.
- 16 Sabherwal N, Blaschke RJ, Marchini A *et al*: A novel point mutation A170P in the *SHOX* gene defines impaired nuclear translocation as a molecular cause for Léri-Weill dyschondrosteosis and Langer dysplasia. *J Med Genet* 2004; **41**: e83.
- 17 Sabherwal N, Schneider KU, Blaschke RJ *et al*: Impairment of *SHOX* nuclear localization as a case for Léri-Weill syndrome. *J Cell Science* 2004; **117**: 3041–3048.
- 18 Benito-Sanz S, Gorbenko Del Blanco D, Aza-Carmona M *et al*: PAR1 deletions downstream of *SHOX* are the most frequent defect in a Spanish cohort of Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) probands. *Hum Mutat* 2006a; **27**: 1062.
- 19 Benito-Sanz S, Gorbenko del Blanco D, Huber C *et al*: Characterization of *SHOX* deletions in Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) reveals genetic heterogeneity and no recombination hotspots. *Am J Hum Genet* 2006; **79**: 409–414.
- 20 Aza-Carmona M, Shears DJ, Yuste-Checa P *et al*: *SHOX* interacts with the chondrogenic transcription factors *SOX5* and *SOX6* to activate the aggrecan enhancer. *Hum Mol Genet* 2011; **20**: 1547–1559.
- 21 May CA, Shone AC, Kalydjieva L, Sajantila A, Jeffreys AJ: Crossover clustering and rapid decay of linkage disequilibrium in the Xp/Yp pseudoautosomal gene *SHOX*. *Nat Genet* 2002; **31**: 272–275.
- 22 Schneider KJ, Marchini A, Sabherwal N *et al*: Alteration of DNA binding, dimerization, and nuclear translocation of *SHOX* homeodomain mutations identified in idiopathic short stature and Léri-Weill dyschondrosteosis. *Hum Mutat* 2005; **26**: 1–9.
- 23 Evans MI, Zador IE, Quereshi F, Budev H, Quigg MH, Nadler HL: Ultrasonographic prenatal diagnosis and fetal pathology of Langer mesomelic dwarfism. *Am J Med Genet* 1998; **31**: 915–920.
- 24 Munns CF, Glass IA, LaBrom R *et al*: Histopathological analysis of Léri-Weill dyschondrosteosis: disordered growth plate. *Hand Surg* 2001; **6**: 13–23.

Supplementary Information accompanies the paper on European Journal of Human Genetics website (<http://www.nature.com/ejhg>)

SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer

Miriam Aza-Carmona^{1,2}, Debbie J. Shears^{3,4}, Patricia Yuste-Checa^{1,2},
Verónica Barca-Tierno^{1,2}, Alfonso Hisado-Oliva^{1,2}, Alberta Belinchón^{1,2},
Sara Benito-Sanz^{1,2}, J. Ignacio Rodríguez⁵, Jesús Argente^{6,7}, Ángel Campos-Barros^{1,2},
Peter J. Scambler³ and Karen E. Heath^{1,2,*}

¹Institute of Medical and Molecular Genetics (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, IdiPAZ, Madrid, Spain, ²Centro de Investigación Biomédica en Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto Carlos III, Madrid, Spain, ³Molecular Medicine Unit, University College Institute of Child Health, London, UK, ⁴Department of Clinical Genetics, Churchill Hospital, Oxford, UK, ⁵Department of Pathology, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain, ⁶Department of Endocrinology, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Instituto de Investigación La Princesa, and Department of Pediatrics, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain and ⁷Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología, Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Received November 29, 2010; Revised and Accepted January 20, 2011

SHOX (short stature homeobox-containing gene) encodes a transcription factor implicated in skeletal development. SHOX haploinsufficiency has been demonstrated in Leri–Weill dyschondrosteosis (LWD), a skeletal dysplasia associated with disproportionate short stature, as well as in a variable proportion of cases with idiopathic short stature (ISS). In order to gain insight into the SHOX signalling pathways, we performed a yeast two-hybrid screen to identify SHOX-interacting proteins. Two transcription factors, SOX5 and SOX6, were identified. Co-immunoprecipitation assays confirmed the existence of the SHOX–SOX5 and SHOX–SOX6 interactions in human cells, whereas immunohistochemical studies demonstrated the co-expression of these proteins in 18- and 32-week human fetal growth plates. The SHOX homeodomain and the SOX6 HMG domain were shown to be implicated in the SHOX–SOX6 interaction. Moreover, different SHOX missense mutations, identified in LWD and ISS patients, disrupted this interaction. The physiological importance of these interactions was investigated by studying the effect of SHOX on a transcriptional target of the SOX trio, *Agc1*, which encodes one of the main components of cartilage, aggrecan. Our results show that SHOX cooperates with SOX5/SOX6 and SOX9 in the activation of the upstream *Agc1* enhancer and that SHOX mutations affect this activation. In conclusion, we have identified SOX5 and SOX6 as the first two SHOX-interacting proteins and have shown that this interaction regulates aggrecan expression, an essential factor in chondrogenesis and skeletal development.

INTRODUCTION

SHOX (short stature homeobox-containing gene) is located in the pseudoautosomal region 1 (PAR1) of the X and Y

chromosomes (1,2). Mutations and deletions of *SHOX* and/or the downstream PAR1 containing *SHOX* enhancer elements have been reported in Leri–Weill dyschondrosteosis (LWD, MIM 127300), Langer mesomelic dysplasia (LMD, MIM

*To whom correspondence should be addressed at: Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Pº Castellana 261, 28046 Madrid, Spain. Tel: +34 917277469; Fax: +34 912071040; Email: kheath.hulp@salud.madrid.org

249700) and idiopathic short stature (ISS, MIM 300582) (1,3–8). LWD is a skeletal dysplasia associated with disproportionate short stature due to mesomelic shortening of the limbs, and the characteristic abnormality of the forearms known as Madelung deformity: bowing of the radius and dorsal dislocation of the distal ulna. Alterations in *SHOX* or its enhancers (*SHOX*/PAR1) have been identified in ~60% of LWD individuals (9–11). LMD is due to homozygous or compound heterozygous *SHOX*/PAR1 alterations resulting in severely disproportionate short stature with marked mesomelic and rhizomelic limb shortening. *SHOX*/PAR1 alterations have also been found in ~5% of ISS cases (11), a condition defined as a height below –2 SDS in the absence of known specific causative disorders (12). Together, the estimated prevalence of *SHOX* haploinsufficiency is 1 in 1000 individuals.

However, there is some evidence suggesting genetic heterogeneity in LWD: first, the molecular defect in 40% of LWD cases remains unknown (9–11), and secondly, the PAR1 has been excluded by linkage analysis as the causative region in a multigenerational LWD family (S. Benito-Sanz *et al.*, unpublished data).

Two *SHOX* isoforms exist, *SHOXa* and *SHOXb* (1), both contain a homeodomain, but only *SHOXa* (*SHOX*) acts as a transcriptional activator in osteogenic cells via its transactivation domain, the OAR (otp, aristaless and rax), which is absent in *SHOXb*. Recently, *NPPB*, which encodes brain natriuretic peptide, an important regulator of endochondral ossification, has been identified as the first transcriptional target of *SHOX* (13).

There is robust evidence in the literature for the implication of *SHOX* in chondrogenesis: (i) *SHOX* is expressed in the middle part of the developing human limbs during chondrogenesis, from the condensing mesenchyme forming the precartilaginous structure of the bone to the start of ossification (14); (ii) *Shox* overexpression promoted chondrogenesis in chicken micromass cultures, observed by the increased expression of *Col2a1* and *Agl1*, which encode the cartilage matrix components collagen type II and aggrecan, respectively, and by the enhanced Alcian blue staining (15); and (iii) *SHOX* overexpression induces growth arrest and apoptosis in human primary chondrocytes (16). Despite these recent advances, the precise role of *SHOX* in bone development still remains elusive.

In order to identify the signalling pathways in which *SHOX* intervenes and to discover potential gene candidates involved in the pathogenesis of LWD, a yeast two-hybrid screen of a whole mouse embryo cDNA library was performed using *SHOX* as bait. Among the large number of potential *SHOX* interactors, we identified two transcription factors, Sox5 and Sox6, which together with Sox9 form the Sox trio, the master complex of chondrogenesis (17). We confirmed that the human SOX5 and SOX6 homologues also interact with *SHOX* and demonstrated that *SHOX* missense mutations impair the *SHOX*–SOX6 interaction. Interestingly, we also showed that *SHOX* cooperates with SOX5/SOX6 and SOX9 in the activation of the *Agl1* enhancer and that *SHOX* mutations impair this activation. In summary, we have identified and characterized SOX5 and SOX6 as the first two *SHOX*-interacting proteins and defined a function for this protein complex during chondrogenesis.

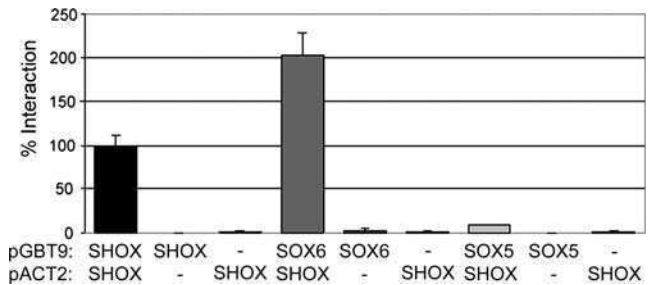


Figure 1. *SHOX* interacts with SOX5 and SOX6 in the yeast two-hybrid system. The *S. cerevisiae* strain Y187 was cotransformed with the pGBT9 and pACT2 vectors. Yeast cells were selected on SD growth medium lacking Trp and Leu. Interactions were determined by using a β -galactosidase liquid assay with CRPG as substrate. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the β -galactosidase units of the different construct combinations to that of *SHOX* homodimerization (black bar). Empty vectors were employed as negative controls. All values represent the mean and the standard deviation of five independent transformation experiments, each performed in triplicate.

RESULTS

Identification of two *SHOX*-interacting proteins

In order to identify proteins which interact with *SHOX*, a whole mouse embryo 9.5–10.5 dpc cDNA library was screened in a yeast two-hybrid system with full-length *SHOX* cDNA as bait. A total of 36 positive colonies were identified. The plasmids containing the cDNA sequence of the putative *SHOX* interaction partners were extracted from the cotransformed PJ69-4A yeast cells, transformed into *Escherichia coli* cultures and sequenced. BLAST searches of the sequences of all positive colonies were performed against EMBL (www.ebi.ac.uk/embl) and SPTR (www.uniprot.org) databases and Unigene clusters (www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene). Twelve of the positive clones (33%) were excluded from further analysis because they lacked biological sense (i.e. the cDNA sequence was out of frame or corresponded to untranslated regions). The remaining 24 positive clones (67%) encoded full-length, or almost full-length, in-frame cDNA inserts. Three of the 24 positive cDNAs (12.5%) corresponded to *Sox5* and *Sox6*, two transcription factors involved in chondrogenesis (18,19). The detected interactions were first validated by means of a bait/prey switch, placing the full-length *SHOX* cDNA in the pVP16 vector and the *Sox5* and *Sox6* cDNA fragments into the pGBDU vector (data not shown). The interactions between the respective proteins were confirmed using SOX5 and SOX6, the human homologues of Sox5 and Sox6. For this purpose, we cloned the human full-length homologue SOX5 and SOX6 cDNAs into the pGBT9 vector and cotransformed them into the yeast cells with pACT2:SHOX. *SHOX* homodimerization was used as a positive control (20). Both human SOX5 and SOX6 interacted with *SHOX* (Fig. 1).

Confirmation of the *SHOX*–SOX5 and *SHOX*–SOX6 interactions

Confirmation of the identified interactions was subsequently performed using coimmunoprecipitation in human cells and immunohistochemical analysis in human fetal growth plates.

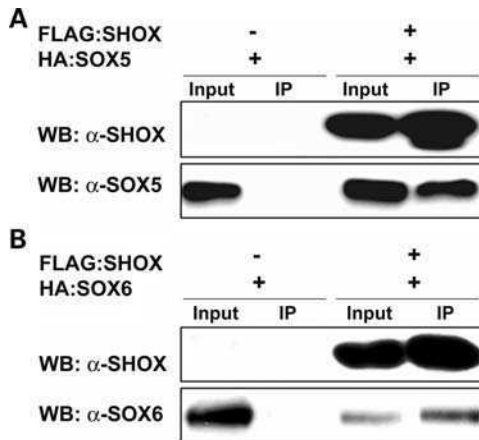


Figure 2. SHOX interacts with SOX5 and SOX6 in human cells. Nuclear extracts of HEK293 cells overexpressing FLAG:SHOX and HA:SOX5 (A) or FLAG:SHOX and HA:SOX6 (B) were immunoprecipitated using anti-FLAG-agarose. Western blots (WB) of immunoprecipitates were probed with SHOX, SOX5 and SOX6 antibodies. Nuclear extracts corresponding to 10% input were included as protein expression controls, and nuclear extract immunoprecipitates of cells transfected only with HA:SOX5 (A) or HA:SOX6 (B) were included as negative controls. The western blot images clearly show that SOX5 and SOX6 immunoprecipitates only in the presence of SHOX.

SHOX interacts with SOX5 and SOX6 in human cells. Nuclear lysates of human HEK293 cells overexpressing the proteins of interest were immunoprecipitated with anti-FLAG-agarose beads and analysed by western blot using SHOX, SOX5 and SOX6 antibodies. In agreement with the yeast two-hybrid experiments, SOX5 and SOX6 coprecipitated with SHOX (Fig. 2), confirming the interaction between these proteins in human cells.

SHOX, SOX5 and SOX6 are coexpressed in 18- and 32-week human fetal growth plates. By immunohistochemistry, we observed the expression of all three proteins in the reserve, proliferative and hypertrophic zones of both gestational ages (Fig. 3, Supplementary material, Figs S1 and S2). Since SOX5 and SOX6 cooperate with SOX9 during chondrogenesis (17) and Sox9 is needed for Sox5 and Sox6 expression (21), we analysed and subsequently confirmed that SOX9 is coexpressed with SHOX, SOX5 and SOX6 in the same zones of both growth plates (Fig. 3, Supplementary material, Figs S1 and S2). These findings provide the first evidence of coexpression of SHOX, SOX5, SOX6 and SOX9 in the human fetal growth plate.

SHOX domains involved in the interaction with SOX6

Since Sox5 and Sox6 have been shown to be highly homologous and functionally redundant (18,19), and in yeast, the SHOX–SOX6 interaction was stronger than SHOX–SOX5, we characterized the domains implicated in the SHOX–SOX5/SOX6 interaction using SOX6 and a series of SHOX domain constructs. Four SHOX constructs, SHOX(1–178), SHOX(1–211), SHOX(117–274) and SHOX(117–292), all of which include the homeodomain, were shown to interact with SOX6 (Fig. 4), thus suggesting that this domain is

implicated in the SHOX–SOX6 interaction. However, the SHOX construct containing only the homeodomain, SHOX(117–178), did not interact with SOX6 (Fig. 4). Thus, either the N- and/or the C-terminal region may participate in the SHOX–SOX6 interaction or may confer structural stability in yeast to the interacting domain, the homeodomain.

SHOX mutants impair the SHOX–SOX6 interaction

To further characterize the interaction between SOX6 and SHOX, we expressed 10 SHOX missense mutations (Fig. 5A) in the pACT2 vector and tested their capacity to bind SOX6 in cotransformation experiments with wild-type SOX6 in the pGBT9 vector. Seven of these mutations, located in the N-terminus or the homeodomain, have been previously reported in patients with LWD or ISS (Fig. 5A; www.hd-lovd.uni-hd.de/). Since no missense mutation in the C-terminal region of SHOX had been described at the time of the assay design, we generated three artificially SHOX mutant proteins, R195P, A233E and D278A, which substitute highly conserved amino acids in the C-terminal region with structurally different residues. Eight missense mutations have since been described in the SHOX C-terminal region (www.hd-lovd.uni-hd.de/), two affecting residues that we targeted: R195N and A233V. All analysed mutant SHOX proteins which failed to bind SOX6 (L132V, R168W, A170P and R173C) harboured mutations located in the homeodomain region (Fig. 5A and B), thus confirming that the SHOX homeodomain is directly involved in the interaction with SOX6. Interestingly, the homeodomain mutation R153L did not impair the ability of SHOX to bind SOX6 (Fig. 5A and B). The N-terminal mutation K116E caused a 60% reduction in the interaction with SOX6 (Fig. 5B), suggesting that this residue, close to the homeodomain boundary, may either participate in the interaction or confer structural stability to the homeodomain. The three mutations located in the C-terminal region caused a milder reduction (25–40%) in SHOX interaction with SOX6 (Fig. 5B). In conclusion, our results indicate that mutations in the SHOX homeodomain, except R153L, affect the interaction with SOX6, confirming that this domain is critical for the interaction with SOX6.

SOX6 domains involved in the interaction with SHOX

To characterize the SOX6 domain involved in the interaction with SHOX, we generated a series of SOX6 cDNA deletion constructs in the pGBT9 vector and used them in cotransformation experiments with the wild-type SHOX in the pACT2 vector (Fig. 6A). Two constructs, SOX6(263–787) and SOX6(479–787), both of which share the DNA-binding HMG domain, interacted with SHOX (Fig. 6), indicating that this domain is directly involved in the interaction with SHOX. The construct containing the HMG domain, SOX6(479–787), interacted with SHOX more weakly than SOX6(263–787), suggesting that the second coiled-coil may also participate in the interaction, although it is unable to interact alone, or, alternatively, it may confer structural stability in yeast to the true interacting domain, the HMG domain.

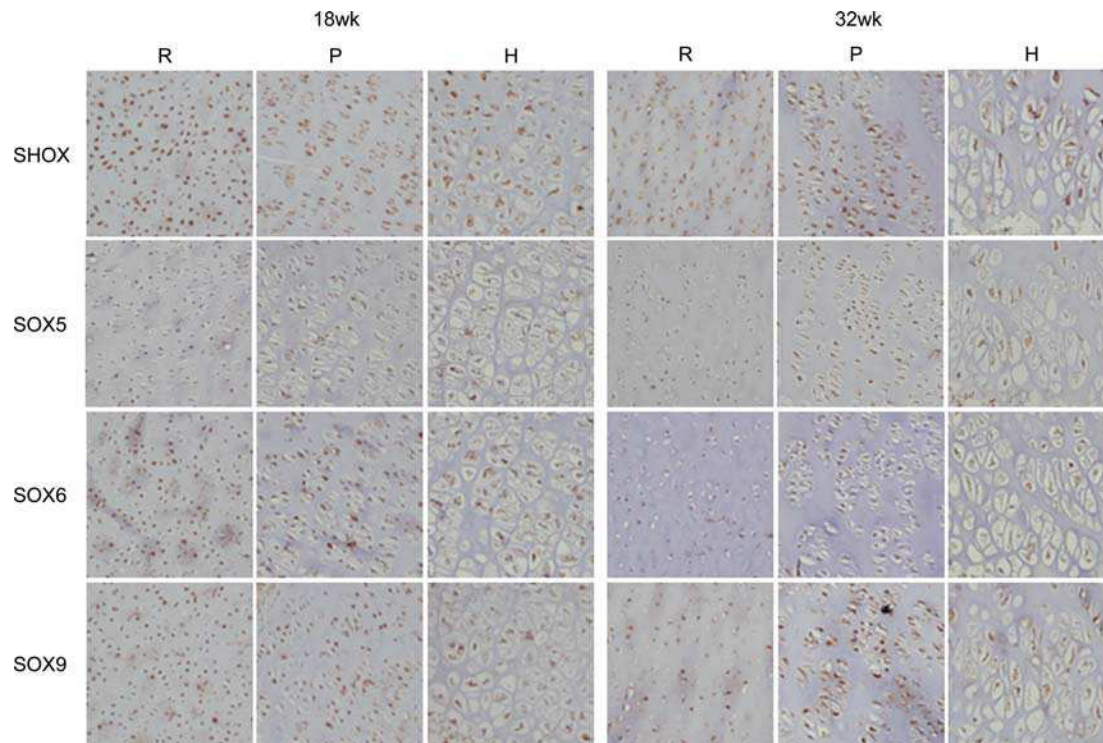


Figure 3. SHOX is coexpressed with SOX5, SOX6 and SOX9 in the human fetal growth plate. Immunohistochemistry performed on 18- and 32-week human fetal tibia growth plates. DAB immunostaining at 20 \times magnification against SHOX, SOX5, SOX6 and SOX9 antibodies in 18- and 32-week fetal growth plates. Specific staining can be observed in the reserve, proliferative and hypertrophic zones of the growth plate for the four proteins.

SHOX cooperates with SOX5/SOX6 and SOX9 in the activation of the *Agc1* enhancer

In order to assess the physiological significance of the SHOX–SOX5 and SHOX–SOX6 interactions, we investigated their capacity to transactivate SOX trio target genes. The SOX trio has been shown to induce aggrecan expression, a marker of chondrocyte differentiation, by activating the *Agc1* enhancer (22). It has also been observed that *Shox* overexpression increased *Agc1* expression in chicken micromass cultures (15), thus suggesting that *Shox* is involved in the expression of *Agc1*.

To examine whether SHOX participates in the expression of *Agc1*, we performed a luciferase assay in U2OS cells. The osteogenic cells were cotransfected with different combinations of SHOX, SOX5/SOX6 and SOX9 expression plasmids and a luciferase reporter plasmid containing four tandem copies of the far-upstream *Agc1* enhancer followed by the *Col2a1* –89 to +6 promoter (22) (kind gift of V. Lefebvre). Coexpression of SHOX with the three SOX proteins was not undertaken as no significant increase in aggrecan expression was previously observed compared with the coexpression of SOX5 or SOX6 with SOX9 (22). Western blot analysis was performed to ensure the expression of the various proteins (data not shown). As described previously, SOX9 overexpression was able to induce the *Agc1* enhancer (22), and coexpression of SOX5 or SOX6 and SOX9 highly activated this enhancer (Fig. 7). In contrast, the coexpression of SHOX with SOX5/SOX6 was unable to induce the *Agc1* enhancer (Fig. 7) and the addition of SHOX did not improve

the transcriptional capacity of SOX9. Interestingly, overexpression of SHOX, SOX5/SOX6 and SOX9 increased the activation of the *Agc1* enhancer (Fig. 7A and B), from which we conclude that SHOX cooperates with SOX5/SOX6 and SOX9 in the activation of the upstream *Agc1* enhancer.

Subsequently, we studied whether SHOX mutants impaired the *Agc1* enhancer activation. The SHOX Q211X mutant, previously denominated as SHOX(1–211) (Fig. 4), failed to activate the *Agc1* enhancer (Fig. 8A and B), whereas L132V and R168W mutants showed a decreased ability to activate the enhancer (Fig. 8A and B). Once again, the SHOX R153L mutant behaved differently when compared with the other homeodomain mutants, retaining its ability to activate the *Agc1* enhancer at levels similar to wild-type SHOX (Fig. 8).

SOX5 and SOX6 mutation screening in LWD individuals without SHOX/PAR1 alterations

In order to explore the involvement of SOX5 and SOX6 in the molecular aetiology of LWD, we undertook mutation screening of the coding regions and intron/exon boundaries of SOX5 and SOX6 in 37 individuals with definite or possible LWD without a known molecular defect. No SOX5 or SOX6 point mutations, small deletions or insertions were identified in this cohort. The probability of complete or intragenic SOX5 deletions was reduced in 36 patients, through the observation of two alleles for a microsatellite marker located in the 5'-flanking region of SOX5, and/or nine intragenic single-nucleotide polymorphisms (SNPs): c.231 + 53 C > A,

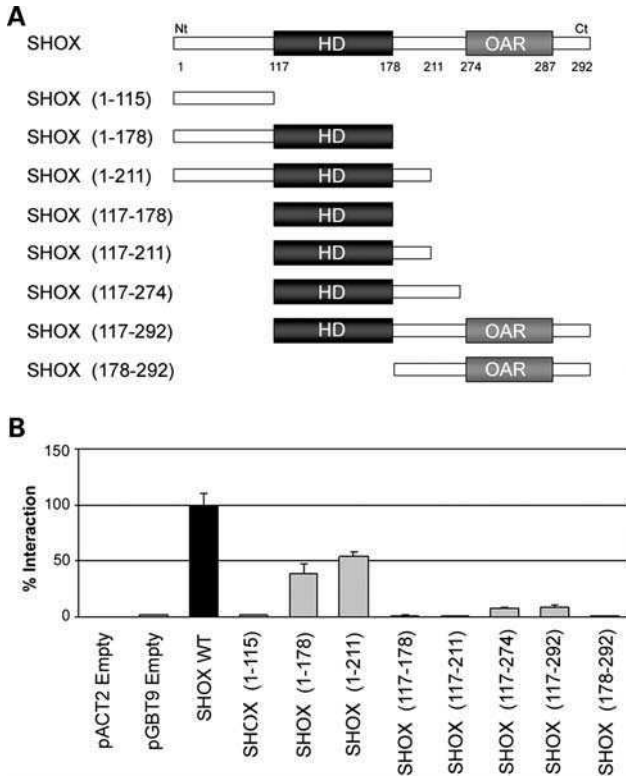


Figure 4. Characterization of the SHOX domains involved in the interaction with SOX6 using the yeast two-hybrid assay. (A) SHOX is schematically drawn showing the amino acid location of the homeodomain (HD) and the OAR domain. The various SHOX fragments, indicating the name of each construct and the amino acids that they contain, are depicted below SHOX. (B) Yeast two-hybrid assay of Y187 cells cotransformed with SOX6 in the pGBT9 vector and different SHOX fragments in the pACT2 vector. Yeast cells were selected on SD growth medium lacking Trp and Leu. Interactions were determined by performing a β -galactosidase liquid assay. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the β -galactosidase units of the various SHOX construct–SOX6 combinations to that obtained with the wild-type SHOX–SOX6 interaction (black bar). Empty vectors were employed as negative controls. All values represent the mean and the standard deviation of five independent transformant colonies, with each colony assayed in triplicate.

rs7980561, rs11047075, c.771 + 118 G > A, rs11047034, rs1479452, rs7485662, rs76722400 and rs4636755. The probability of the existence of complete or partial *SOX6* deletions was reduced in 32 patients by a self-designed MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) assay and/or by the presence in heterozygosity of at least one of the observed intragenic SNPs: rs4617548, c.1733-41 C > T and c.2183 + 7 A > G.

DISCUSSION

In this work, we identified SOX5 and SOX6 as SHOX-interacting proteins using a yeast two-hybrid assay and confirmed the findings by coimmunoprecipitation in human cells and immunohistochemistry in human fetal growth plates. The domains involved in the SHOX–SOX6 interaction were characterized using protein fragments and a series of SHOX mutants. These experiments revealed that the SHOX

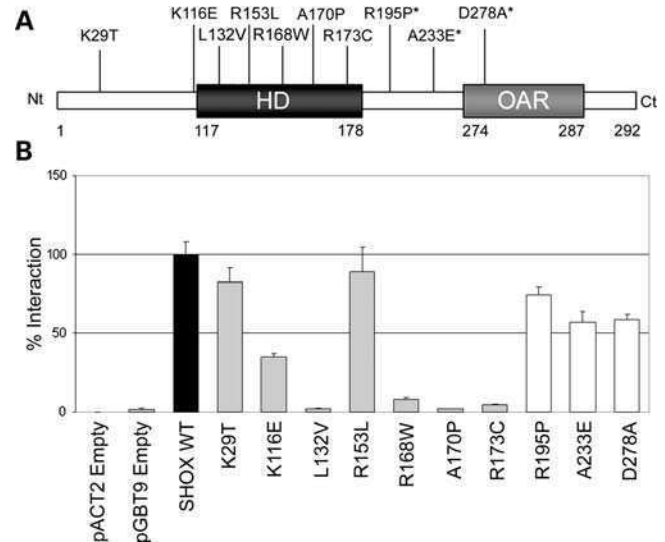


Figure 5. SHOX mutants impair the SHOX–SOX6 interaction. (A) SHOX protein structure scheme showing the homeodomain (HD) and the OAR domain. The 10 missense mutations analysed in this study are indicated. Mutations not reported in patients with LWD or ISS are marked with an asterisk. (B) Yeast two-hybrid assay of Y187 cotransformed cells with SOX6 in the pGBT9 vector and the different SHOX mutants in the pACT2 vector. Yeast cells were selected on SD growth medium lacking Trp and Leu. Interactions were determined by performing a β -galactosidase liquid assay. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the β -galactosidase units of the various SHOX mutant–SOX6 combinations to the wild-type SHOX–SOX6 interaction (black bar). The grey bars correspond to the mutations reported in LWD or ISS patients and the white bars indicate the mutations that have not been reported in LWD/ISS individuals and that were created by us. Empty vectors were employed as negative controls. All values represent the mean and the standard deviation of five independent transformant colonies, with each colony assayed in triplicate.

homeodomain interacts with the HMG domain of SOX6. Our data are therefore consistent with previous reports, where the Sox HMG domain has been shown to interact with the DNA-binding domain of several transcription factors (23). However, we cannot discard that the N- and C-terminal regions of SHOX and the SOX6 second coiled-coil are also implicated in the SHOX–SOX6 interaction, at least conferring structural stability to the interacting domains.

Four of the five analysed SHOX homeodomain mutants failed to interact with SOX6, whereas, interestingly, the R153L mutation retained its binding ability. This is the only analysed mutation in helix II of the homeodomain, suggesting that helix II does not participate in the interaction with SOX6 or that this change does not affect the interaction with SOX6. The SHOX mutants located outside of the homeodomain showed a variable reduction in their interaction ability, suggesting that the conformation of the SHOX protein may be important for the interaction with SOX5 and SOX6.

Both Sox5 and Sox6 are essential for chondrogenesis (24), cooperating with Sox9 to form the Sox trio, which has been shown to directly activate three genes encoding extracellular matrix proteins: *Col2a1* (25), *Agl1* (22) and *Comp* (26). However, it has been suggested that additional unknown transcription factors work together with the Sox trio to promote chondrocyte overt differentiation (17). Little is known about the function and signalling pathways in which SHOX

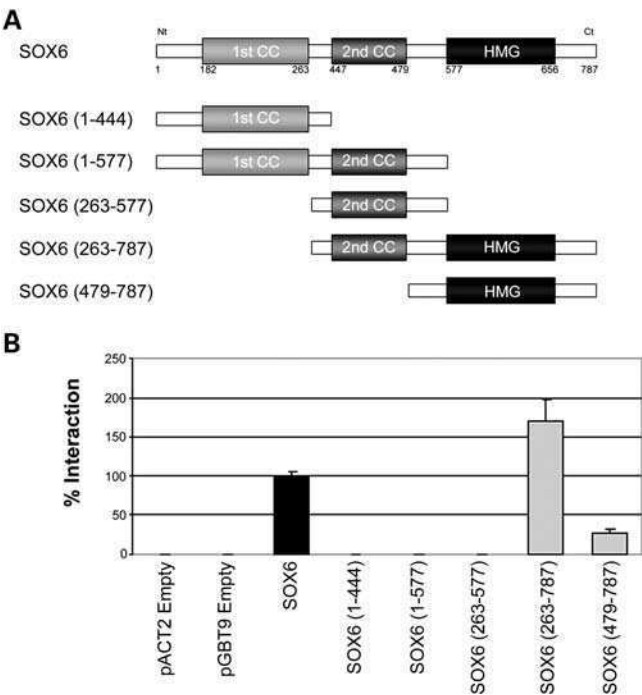


Figure 6. Characterization of SOX6 domains involved in the interaction with SHOX using the yeast two-hybrid assay. **(A)** SOX6 is schematically drawn showing the amino acid location of two dimerization domains, the first and the second coiled-coils (1st cc and 2nd cc, respectively), and a DNA-binding domain, the HMG domain. Depicted below are the SOX6 generated constructs, indicating the name of each fragment by the amino acids which they contain. **(B)** Yeast two-hybrid assay of Y187 cotransformed cells with the different SOX6 fragments in the pGBT9 vector and SHOX in the pACT2 vector. Yeast cells were selected on SD growth medium lacking Trp and Leu. Interactions were determined by performing a β -galactosidase liquid assay. The protein interaction percentages were obtained by normalizing the β -galactosidase units of the different SOX6 fragment–SHOX combinations to that obtained with the wild-type SOX6–SHOX interaction (black bar). Empty vectors were employed as negative controls. All values represent the mean and the standard deviation of five independent transformant colonies, with each colony assayed in triplicate.

intervenes but it has been observed that *Shox* overexpression promotes chondrogenesis in chicken micromass cultures, shown by increased *Col2a1* and *Agc1* expression (15). These observations prompted us to study the role of SHOX–SOX5 and SHOX–SOX6 interactions in the regulation of the SOX trio transcriptional target, *Agc1*. SHOX was shown to cooperate with SOX5/SOX6 and SOX9, significantly activating the transcriptional activity of the *Agc1* enhancer.

This cooperation was impaired by SHOX mutants which altered the transcriptional activity of the *Agc1* enhancer. SHOX mutants that were unable to interact with SOX6, such as the homeodomain mutants L132V and R168W, also altered the transcriptional activity of the *Agc1* enhancer. In contrast, the R153L homeodomain mutant retained its ability to bind to SOX6 and activate the *Agc1* enhancer, but failed to transactivate *NPPB* (13), thus suggesting that the molecular mechanism by which SHOX transactivates *NPPB* and *Agc1* is different. These results suggest that the SHOX–SOX6 interaction is important for the activation of the *Agc1* enhancer. However, since the L132V and R168W mutants cannot dimerize to SHOX or bind DNA, and the R153L mutant

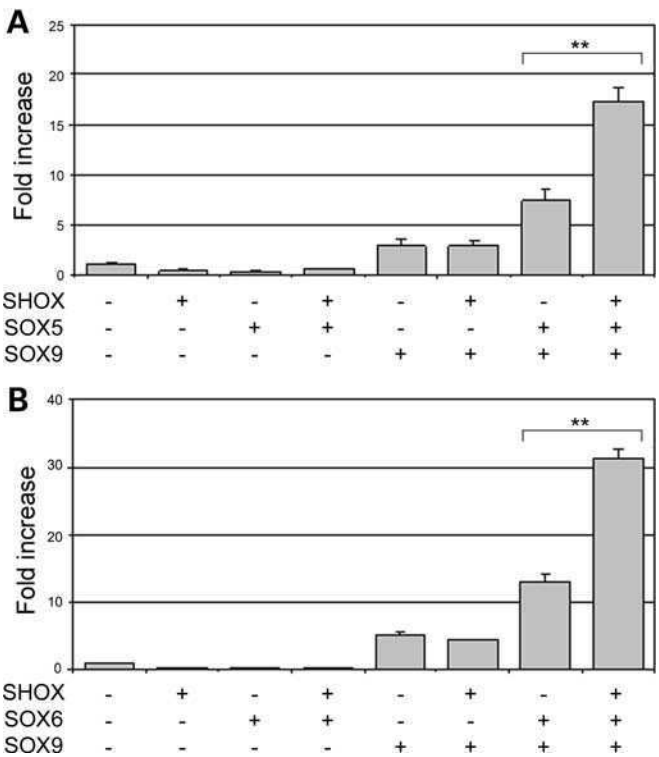


Figure 7. SHOX cooperates with SOX5/SOX6 and SOX9 in the activation of the *Agc1* enhancer. Luciferase reporter activity of U2OS cells transfected with the (4XA1)pCol2Luc reporter plasmid, renilla luciferase control plasmid and different combinations of the SHOX, SOX5 and SOX9 **(A)**; or SHOX, SOX6 and SOX9 **(B)** expression plasmids as indicated below the graph. Fold-increase values were obtained by normalizing the relative luciferase units of each sample with the relative units of the sample that was transfected with the reporter plasmid alone. All values represent the mean and the standard deviation of three independent samples, with each sample assayed in triplicate. $^{**}P < 0.001$ compared with the SOX5:SOX9 and SOX6:SOX9 transfections, respectively.

conserves these abilities (27), we cannot exclude the possibility that the L132V and R168W mutants failed to activate the *Agc1* enhancer because they lost their capacity to transactivate. The SHOX mutant Q211X, which lacks the OAR domain, conserved its interaction capacity with SOX6 (50%), but failed to activate the *Agc1* enhancer, thus indicating that the transactivation domain of SHOX is necessary for the activation of the *Agc1* enhancer. Despite these molecular findings, the phenotype observed in individuals with these four mutants is indifferent, presenting predominantly as LWD but in a few cases as ISS.

We searched for the presence of SHOX-binding sequences, i.e. P2–P6 elements, in the *Agc1* enhancer. No P2–P6 element sequence with $>75\%$ identity to the consensus sequence of other homeodomain proteins was detected (Jaspar database, www.jaspar.genereg.net/). However, no perfect binding site was found in the SHOX-binding region of the *NPPB* promoter (13), suggesting that SHOX may bind, *in vivo*, to an imperfect P element in the *Agc1* enhancer. In support of this hypothesis, we excluded the possibility that SHOX acts as a connecting protein between SOX5/SOX6 and SOX9 by coimmunoprecipitation (Supplementary material, Fig. S3). Thus, we propose that the SHOX homeodomain interacts

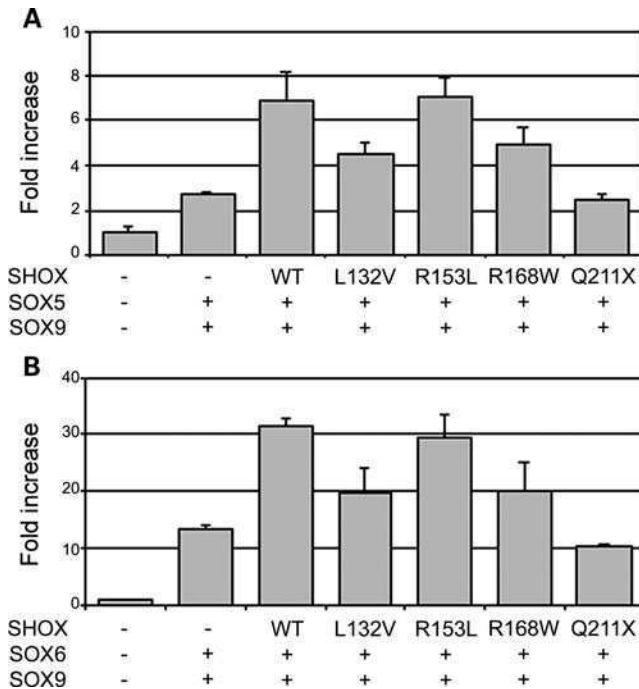


Figure 8. SHOX mutants affect the activation of the *Agc1* enhancer. Luciferase reporter activity of U2OS cells transfected with the (4XA1)pCol2Luc reporter plasmid, renilla luciferase control plasmid and different combinations of the SOX5 (A) or SOX6 (B), SOX9, SHOX wild-type and mutant expression plasmids as indicated below the graph. Fold-increase values were obtained by normalizing the relative luciferase units of each sample with the relative units of the sample which was transfected with the reporter plasmid alone. All values represent the mean and the standard deviation of three independent samples, with each sample assayed in triplicate.

with the SOX5/SOX6 HMG domain, whereas SOX5/SOX6 and SOX9 are bound to the *Agc1* enhancer and SHOX may or may not be bound to this regulatory region.

We also showed that SHOX, SOX5, SOX6 and SOX9 are coexpressed in resting, proliferative and hypertrophic chondrocytes of the 18- and 32-week human fetal growth plates. Our data are not concordant with the *Sox5*, *Sox6* and *Sox9* mRNA expression data reported in mouse embryos, where *Sox5*, *Sox6* and *Sox9* were turned off upon chondrocyte prehypertrophy (25). However, immunohistochemical staining of tibia growth plate sections of an E16 mouse fetus (Supplementary material, Fig. S4) and previously described immunohistochemistry assays performed in E17.5 mouse fetal growth plates (28) confirmed that Sox5, Sox6 and Sox9 proteins are also expressed in mouse hypertrophic chondrocytes.

Both models of three null allele *Sox5* and *Sox6* knockout mice had short and bent forelimbs (19), showing some similarities to the phenotype observed in LWD, thus suggesting that *Sox5* and *Sox6* could be alternative genes implicated in this aetiology. However, mutation screening of SOX5 and SOX6 coding regions did not detect any mutation in the studied cohort. Analysis of a larger cohort and mutation screening of the SOX5 and SOX6 regulatory regions are necessary to properly assess their involvement in this pathology.

In conclusion, our work has identified the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 as the two first SHOX-

interacting proteins and has shown that SHOX cooperates with SOX5/SOX6 and SOX9 in the activation of the *Agc1* enhancer that regulates the expression of aggrecan, an essential extracellular matrix component of cartilage. Our work provides an insight into the function of SHOX and improves our knowledge about chondrogenesis and skeletal development.

MATERIALS AND METHODS

Generation of recombinant constructs

The full-length cDNA of *SHOX* (NM_000451), *SOX5* (NM_152989), *SOX6* [corresponding to a splicing variant highly expressed in chondrocytes and lacking exon 9 but including exon 14a, using the exonic nomenclature described by Cohen-Barak *et al.* (29), and kindly donated by Dr T. Ikeda] and *SOX9* (NM_000346) were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into the pCR2.1 vector (Invitrogen) using appropriate oligonucleotides (Table 1) and TA cloning (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Full-length *SHOX* cDNA was first subcloned into the pEG202 expression vector (Clontech) and then shuttled into the yeast expression vector pGBDU (kindly donated by Dr Stan Hollenberg, Vollum Institute, OR, USA). *SHOX* cDNA was also subcloned into the yeast expression vector pACT2 (Clontech) and the mammalian expression vectors pcDNA3-FLAG and pcDNA3-HA (Invitrogen). *SOX5* and *SOX6* cDNAs were subcloned into the yeast expression vector pGBT9 (Clontech) and into the mammalian expression vector pcDNA3-HA (Invitrogen), as was *SOX9* cDNA. *SOX6* cDNA was also subcloned into the mammalian expression vector pcDNA3-FLAG (Invitrogen). Various *SHOX* and *SOX6* fragments were also inserted into the TA cloning vector using appropriate oligonucleotides (Table 1) and subsequently subcloned into the vectors pACT2 and pGBT9, respectively. The introduction of the *SHOX* missense mutations and the generation of some *SHOX* and *SOX6* fragments were performed using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), appropriate mutagenic oligonucleotides (Table 2) and different plasmids as templates. All expression constructs were sequenced to exclude the presence of undesired mutations resulting from PCR amplification. The previously reported *Agc1* enhancer plasmid (4XA1)pCol2Luc (22) was kindly donated by Dr Veronique Lefebvre. This consisted of four tandem repeats of a 359 bp cartilage-specific enhancer, which starts 9477 bp upstream the *Agc1* mouse transcription start site (4XA1), followed by -89 to +6 *Col2a1* promoter (pCol2) driving the expression of the firefly luciferase gene (Luc).

Yeast two-hybrid screens

We used the pGBDU:SHOX full length as bait, a whole mouse embryo 9.5–10.5 dpc random primed cDNA library in pVP16 (kindly donated by Dr Stan Hollenberg, Vollum Institute, OR, USA) and the *Saccharomyces cerevisiae* strain PJ69-4A. In brief, yeast cells containing the bait plasmid were transformed with the cDNA library using the LiAc/ssDNA/PEG-heat shock protocol following the manufacturer's instructions (Matchmaker Yeast Protocol Handbook, Clontech). We screened

Table 1. Oligonucleotide sequences for the cloning of the SHOX, SOX5 and SOX6 constructs

| Constructs | Restriction enzyme sites | Sense oligonucleotide 5'–3' | Antisense oligonucleotide 5'–3' |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| pEG202:SHOX | <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III | TTAggatccCAGCCATGGAAGAGCTCACG | GTAAagcttGCGAGCCCCAGGGCCTCCGCGTGCT |
| pACT2:SHOX | <i>Nco</i> I/ <i>Bam</i> HI | ccatggCGATGGAAGAGCTCACGGCT | ATggatccTCAGAGCCCCAGGGCCTC |
| pACT2:SHOX(117–292) | <i>Nco</i> I/ <i>Bam</i> HI | CGccatggATCAGAGGCGCAGCCGCA | ATggatccTCAGAGCCCCAGGGCCTC |
| pACT2:SHOX(178–292) | <i>Nco</i> I/ <i>Bam</i> HI | CGccatggATCAGATGCATAAAGGCG | ATggatccTCAGAGCCCCAGGGCCTC |
| pcDNA3-HA:SHOX | <i>Xba</i> I/ <i>Apa</i> I | GCtctagaATGGAAGAGCTCACGGCT | ATgggcccTCAGAGCCCCAGGGCCTC |
| pcDNA3-FLAG:SHOX | <i>Xba</i> I/ <i>Apa</i> I | GCtctagaATGGAAGAGCTCACGGCT | ATgggcccTCAGAGCCCCAGGGCCTC |
| pGBT9:SOX6 | <i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I | CgaattcATGTCTTCCAAGCAAGCCACC | CgtcgacCTCAGTTGGCACTGACAGCC |
| pGBT9:SOX6(263–577) | <i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I | CgaattcATGCCTCCGCTCATGATCCCA | CgtcgacCGCTGCTGGCACGGCCGCGG |
| pGBT9:SOX6(263–787) | <i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I | CgaattcATGCCTCCGCTCATGATCCCA | CgtcgacCTCAGTTGGCACTGACAGCC |
| pGBT9:SOX6(479–797) | <i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I | CgaattcGGTGTGTGACGGGAAACTGTCC | CgtcgacCTCAGTTGGCACTGACAGCC |
| pcDNA3-HA:SOX6 | <i>Xba</i> I/ <i>Eco</i> RI | CtctagaATGTCTTCCAAGCAAGCCACC | CgaattcCTCAGTTGGCACTGACAGCC |
| pcDNA3-FLAG:SOX6 | <i>Xba</i> I/ <i>Eco</i> RI | CtctagaATGTCTTCCAAGCAAGCCACC | CgaattcCTCAGTTGGCACTGACAGCC |
| pGBT9:SOX5 | <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I | CggatccGAATGTCTTCCAAGCGACCAGCC | CgtcgacTCAGTTGGCTTGTCTGCAATATGG |
| pcDNA3-HA:SOX5 | <i>Xba</i> I/ <i>Eco</i> RI | GCtctagaATGTCTTCCAAGCGACCAGCC | CgaattcTCAGTTGGCTTGTCTGCAATATGG |
| pcDNA3-HA:SOX9 | <i>Xba</i> I/ <i>Eco</i> RI | GtctagaATGAATCTCCTGGACCCCTTC | CgaattcTCAAGTCGAGTGAGCTGTG |

The incorporated enzymes sites are indicated with lower case letters.

Table 2. Oligonucleotide sequences for the generation of the SHOX and SOX6 fragments and the SHOX missense mutants

| Construct | Construct template | Mutation introduced | Sense oligonucleotide 5'–3' |
|-----------------------|---------------------|---------------------|--|
| pACT2:SHOX(1–211) | pACT2:SHOX | Q211X | CGGATGCCTTTCCAAtAGGTCCAGGCTCAG |
| pACT2:SHOX(117–211) | pACT2:SHOX(117–292) | | |
| pcDNA3-HA:SHOX(Q211X) | pcDNA3-HA:SHOX | | |
| pACT2:SHOX(1–115) | pACT2:SHOX | K115X | GACCAAGCTGtAACAGAGGGCGC |
| pACT2:SHOX(1–178) | pACT2:SHOX | Q178X | CGCAAACAAGAGAAAtAGATGCATAAAGGCGTC |
| pACT2:SHOX(117–178) | pACT2:SHOX(117–292) | | |
| pACT2:SHOX(117–274) | pACT2:SHOX(117–292) | S274X | CAACAGCAAGAATTAgCAGCATCGCCG |
| pACT2:SHOX(K29T) | pACT2:SHOX | K29T | CGGCGGAGGTAcGAAGAGATTCCATTACG |
| pACT2:SHOX(K116E) | pACT2:SHOX | K116E | CAGACCAAGCTGgAACAGAGGCGCAGC |
| pACT2:SHOX(L132V) | pACT2:SHOX | L132V | GCAGCTGAACGAGgTCGAGCGACTCTTC |
| pcDNA3-HA:SHOX(L132V) | pcDNA3-HA:SHOX | | |
| pACT2:SHOX(R153L) | pACT2:SHOX | R153L | CGCGAGGAGCTCAGCCAGCtCCTGGGGCTCTCCGAGGC |
| pcDNA3-HA:SHOX(R153L) | pcDNA3-HA:SHOX | | |
| pACT2:SHOX(R168W) | pACT2:SHOX | R168W | AGGTTTGGTTCCAGAACtGGAGAGCCAAGTGCC |
| pcDNA3-HA:SHOX(R168W) | pcDNA3-HA:SHOX | | |
| pACT2:SHOX(A170P) | pACT2:SHOX | A170P | GGTTCAGAACCgGAGAcCCAAGTGCCGCAACAAG |
| pACT2:SHOX(R173C) | pACT2:SHOX | R173C | GAACCGGAGAGCCAAGTGcGCAAACAAGAGAATCAG |
| pACT2:SHOX(R195P) | pACT2:SHOX | R195P | GACGCTGCCCAGTGGCACCCTACGTC |
| pACT2:SHOX(A233E) | pACT2:SHOX | A233E | CACCCGCACCTGGaGGCGCACGCGCCC |
| pACT2:SHOX(D278A) | pACT2:SHOX | D278A | CCAGCATCGCCGcCTCGGGCTCAAGG |
| pGBT9:SOX6(1–444) | pGBT9:SOX6 | S445X | CTATCTAGTCTCAACTAgCCTGCCCTTTTGGG |
| pGBT9:SOX6(1–577) | pGBT9:SOX6 | E577X | GGCCGTGCCAGCAGCTAGCCACACATTAAGC |

The mutated site is indicated with lower case letters.

~250 000 transformants for growth in synthetic dropout (SD) interacting media lacking leucine, uracyl and histidine amino acids (Clontech) and supplemented with 2 mM 3-aminotriazole (3AT, Sigma). The plates were incubated at 30°C for 3–5 days. Colonies (*n* = 51) were replated in duplicate onto SD media lacking leucine, uracyl, adenine and histidine (Clontech) and supplemented with 3.5 mM 3AT. Four of the 51 colonies picked showed no growth on this medium and were excluded from further analysis. β-Galactosidase assays on duplicates of these cotransformations excluded an additional four colonies as they were negative for this assay. Overnight cultures of the 43 remaining colonies were grown from the duplicate plate. The insert from the library plasmid was amplified by PCR. Single PCR products obtained for 36 of these samples were sequenced using oligonucleotides surrounding

the cloning site. In order to exclude the spurious activation of the system, the pGBDU:SHOX bait was transformed with PVP16 empty vector into PJ69-4A yeast cells, and cells were replated in duplicate onto SD interacting media (SD media lacking leucine and uracyl; SD media lacking leucine, uracyl and adenine; SD media lacking leucine, uracyl and histidine and supplemented with 3.5 mM 3AT). No autoactivation was detected.

Yeast two-hybrid cotransformation and β-galactosidase liquid assay

Cotransformations of the human *SHOX*, *SOX5* and *SOX6* constructs into *S. cerevisiae* strain Y187 were performed using the LiAc/ssDNA/PEG-heat shock protocol. Transformed cells

Table 3. Oligonucleotide sequences and dHPLC conditions for the mutation screening of the coding exons and intron/exon boundaries of *SOX5*

| SOX5 exon | Oligonucleotide sequence Sense (5'–3') | Antisense (5'–3') | Temp. ann. (°C) | Size (bp) | dHPLC gradient (% buffer B) | dHPLC temp. (°C) |
|-----------|---|---------------------------|--------------------|--------------|--|------------------------------|
| 1 | CCCCTAACCACACAATGACG | AGTCTTGAAAAATACAAAAGAAACG | 56 | 516 | 58.8–67.8 58.8–67.8 58.8–67.8 58.8–67.8 | 57.0 58.0 60.0 53.5 |
| 2 | TCACCTTTTAATCTTTCAGCTGAAT | AGAGGTGAGGGCAGAAATAC | 54 | 520 | 58.8–67.8 58.8–67.8 58.8–67.8 58.8–67.8 | 55.0 59.0 55.2 56.4 |
| 3 | TTTTTGATGAAGCCATTATG | AGAGGTGAGGGCAGAAATAC | 52 | 599 | 55.0–64.0 55.0–64.0 | 56.4 54.6 |
| 4 | TGTACTATCTATTGTGCCAGAGAGC | GGGAGGTGGAAGGGACTCTTAT | 54 | 509 | 58.7–67.7 58.7–67.7 58.7–67.7 | 58.1 59.9 53.5 |
| 5 | TTAGGAGCACAGACACGTCTAT | AGCATAAGATGAAAATAACTGTTAG | 52 | 435 | 57.6–66.6 57.6–66.6 57.6–66.6 | 55.5 56.9 55.6 |
| 6 | AGTCCCAAAGCATATCCTCAAGC | ATTGAATTATAAAGAATATTGGC | 53 | 491 | 58.5–67.5 58.5–67.5 58.5–67.5 | 58.0 60.0 55.6 |
| 7 | TAATTTCAGGTGGAGAGTAGATAA | GGCTAAAAATTAAGAGAATCAACA | 55 | 323 | 55.4–64.4 55.4–64.4 55.4–64.4 | 57.5 59.0 55.4 |
| 8 | ATAGGAAAAATACCATATCTGAATA | CCCTTACTTGATTCTTACCTC | 54 | 381 | 56.7–65.7 56.7–65.7 56.7–65.7 | 59.4 60.4 56.5 |
| 9 | TTGAAGGAGGCATTATGTTGACAGC | GAATTCAAGCCGTGTATAGAGTG | 56 | 458 | 58.0–67.0 58.0–67.0 58.0–67.0 | 57.5 59.5 53.6 |
| 10 | AAAGTGATTTTATGGTTAAACGCT | GATGAGGCCTTCTATATTAATGG | 53 | 370 | 56.5–65.5 56.5–65.5 56.5–65.5 | 55.8 59.0 53.8 |
| 11 | GGAGTTAATGTATTATAATGTGGC | AGTTTTAATTGGCACTACCTAGA | 51 | 269 | 53.7–62.7 53.7–62.7 53.7–62.7 | 55.0 56.5 54.9 |
| 12 | TTTAACGCTAACACGAAGTG | AATGATCAGTAGCAATATCTAGTGG | 54 | 539 | 59.0–68.0 59.0–68.0 59.0–68.0 | 56.9 57.9 55.5 |
| 13 | TAGATTTTCTTGTCTCAGCCATA | TTTTTCAAGATCATGTGGGAGACTA | 55 | 459 | 58.0–67.0 58.0–67.0 58.0–67.0 | 57.5 61.0 55.0 |
| 14 | GAGTTTGAAAAATGTTAGGCA | GGCCACTGGTAAGGATG | 56 | 514 | 58.7–67.7 58.7–67.7 58.7–67.7 | 57.5 57.5 61.5 |

were grown on SD plates lacking tryptophan and leucine (Clontech) at 30°C for 3–5 days. For interaction studies, β -galactosidase liquid assays using chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CRPG, Sigma-Aldrich) as substrate were performed according to the Matchmaker Yeast Protocol Handbook (Clontech).

Coimmunoprecipitation

HEK293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen). Twenty-four hours before transfection, cells were seeded in a 10 cm plate at a density of 3×10^6 cells. Medium was changed prior to transfection. Cells were then cotransfected with 10 μ g of each plasmid using FUGENE6 transfection reagent (Roche) at a FUGENE6:DNA ratio of 2.5:2. Twenty-four hours post-transfection, cells were lysed using the reagents from the Nuclear Complex co-IP kit (Active Motif)

and following the manufacturer's instructions. Nuclear extracts were immunoprecipitated with 20 μ l of anti-FLAG M2-agarose beads (Sigma-Aldrich) using reagents of the Nuclear Complex co-IP kit (Active Motif) and following the manufacturer's instructions.

Western blot analysis

Proteins from cell extracts and immunoprecipitation samples were separated by sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membrane (BioRad). Membranes were blocked overnight at 4°C in TN buffer (Tris 50 mM, pH = 8, NaCl 150 mM, Sigma-Aldrich) with 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich), 5% non-fat dry milk and 3% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich). Blots were then incubated for 2 h at room temperature with various antibodies: rabbit polyclonal anti-SHOX (20) at a dilution of 1:3000, rabbit polyclonal anti-SOX5 (Ab26041, Abcam) at a dilution of 1:2000, rabbit polyclonal anti-SOX6

Table 4. Oligonucleotide sequences and dHPLC conditions for the mutation screening of the coding exons and intron/exon boundaries of *SOX6*

| <i>SOX6</i> exon | Oligonucleotide sequence Sense (5'–3') | Antisense (5'–3') | Temp. ann. (°C) | Size (bp) | dHPLC gradient (% buffer B) | dHPLC temp. (°C) |
|---------------------|---|------------------------|--------------------|--------------|--|------------------------------|
| 2 | GGACCACAAATATCTCTAAAGT | CTGGTAGTTGTTTCATGATCT | 53 | 490 | 58.4–67.4 58.4–67.4 58.4–67.4 | 56.0 59.0 59.8 |
| 3 | CTAAGCATCATATACTGTCTC | GCCATCACCATAGTAACCTC | 53 | 458 | 58.0–67.0 58.0–67.0 58.0–67.0 | 54.0 56.0 60.0 |
| 4 | TATCCTGGGGTTCAAGCTACA | GTGGGGAAATTTTTCAGTTTGT | 52 | 412 | 57.3–66.3 57.3–66.3 57.3–66.3 | 52.1 53.5 54.5 |
| 5 | TACTCTCTGGTGTCTGTACC | CTTACAACAAATAAGCCAATCA | 56 | 418 | 57.4–66.4 57.4–66.4 | 55.7 60.7 |
| 6 | GAGGTAATGGCAGAGGTGTAAG | TTTATAAGACAGGGGTACATC | 51 | 226 | 57.1–66.1 57.1–66.1 | 55.5 56.4 |
| 7 | TCTGATCATAGGCTCTCTTCTG | CATAGTTCCTGGCATGCTCC | 55 | 251 | 53.0–62.0 53.0–62.0 53.0–62.0 | 61.0 61.5 63.0 |
| 8 | TTTGGGCTTAGAGCAATGTTG | AGTCCTAATGTGATCTTTTCC | 53 | 403 | 57.1–66.1 57.1–66.1 57.1–66.1 | 54.8 57.3 58.8 |
| 9 | CAGTGCCACTGTTTGATACTGT | GAAGAGCCTCCTTAGGAATG | 53 | 456 | 55.9–64.9 55.9–64.9 | 58.1 59.1 |
| 10 | GGCTGTCTGAGAAATCTAACAA | CCTGTTTCTCAATGCTCAATTA | 55 | 416 | 57.3–63.3 57.3–63.3 57.3–63.3 | 57.0 58.5 61.0 |
| 11 | GTAGGAGAATGTGGCATTGT | CTTTTACTAAGGAGCACTTTGG | 55 | 402 | 57.1–66.1 57.1–66.1 57.1–66.1 | 54.7 56.7 60.7 |
| 12 | CTACAGGGGAGGGGATAGTAGT | GGGCGTATTTGTTAATCAAC | 56 | 456 | 58.0–67.0 58.0–67.0 58.0–67.0 | 57.0 59.1 60.5 |
| 13 | CAAACAGCTTTCAACGGAATCT | CATTTCTTTGCTTTGCCTAA | 55 | 404 | 57.1–66.1 57.1–66.1 57.1–66.1 57.1–66.1 | 54.7 56.1 56.8 58.8 |
| 14 | CGGCAAGCTGTGTGACATTAT | AGCTGGCTGACCTTCGTCTAAC | 59 | 444 | 57.8–66.8 57.8–66.8 | 57.9 60.1 |
| 15 | AATATGTTGCCTTGACCACTTG | CTATGACACAGCAAAGATTCTC | 55 | 420 | 57.4–66.4 57.4–66.4 57.4–66.4 | 58.2 58.7 59.0 |
| 16 | GGGCTCCCTTTTGAAAGTGTAG | CATGCGGGCTCTTAATAACTC | 57 | 484 | 58.4–67.4 58.4–67.4 58.4–67.4 | 55.5 57.5 59.0 |

(Sc-20092, Santa Cruz Biotechnology) at a dilution of 1:2000, rabbit polyclonal anti-SOX9 (Ab3697, Abcam) at a dilution of 1:2000, mouse monoclonal anti-FLAG antibody (Sigma-Aldrich) at a dilution of 1:3000 and mouse monoclonal anti-HA antibody (Sigma-Aldrich) at a dilution of 1:2000. After washing, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary goat anti-rabbit antibody or with horseradish peroxidase-conjugated secondary rabbit anti-mouse antibody (Pierce). Finally, proteins were visualized with the Western lightning chemiluminescence reagent plus (Perkin Elmer).

Immunohistochemistry

Human tibia growth plate sections were obtained from two spontaneously aborted normal fetuses of 18 and 32 weeks, after obtaining informed consent. Paraffin sections of growth plates were deparaffinized and rehydrated to water. Exogenous

peroxidase was quenched with 0.3% H₂O₂ in methanol, and the non-specific antibody-binding sites were blocked using 10% normal goat serum (Vector Laboratories). The sections were incubated at 4°C overnight with the antibodies, described previously, at the following dilutions: SHOX (1:50), SOX5 (1:50), SOX6 (1:25) and SOX9 (1:50). The biotin/avidin–horseradish peroxidase system (ABC Universal kit, Vector Laboratories) was used to detect antibody binding, and diaminobenzidine (DAB; Vector Laboratories) was used to visualize the results. Cells were then stained with haematoxylin (Sigma-Aldrich) for 2 min and finally mounted with Depex (BDH). Negative controls were performed by (i) replacing the primary antibody with phosphate-buffered saline, (ii) using a rabbit polyclonal IgG isotype control (Ab27472, Abcam) at a dilution of 1:50 or (iii) using preimmune serum from the rabbit immunized with the SHOX peptide, at a dilution of 1:1000. Sections of a normal adult colon were also used as negative control tissue with the SHOX, SOX5,

Table 5. SOX6 self-designed MLPA

| Probe | Chromosome location | SOX6 exon | Length (bp) | Sequence at ligation site |
|----------|---------------------|-----------|-------------|--|
| SOX6- 2 | 11p15.3 | Exon 2 | 94 | CAAGATGCTGACTGGGACAGCGTTCT-GTCATCTCAGCAAAGAATGGTGAGCC |
| SOX6- 3 | 11p15.3 | Exon 3 | 104 | CAAAGGGAGTCTTGCCGATGTGGT-GGACACACTGAAACAGAAGAAGCTTGAGG |
| SOX6- 5 | 11p15.3 | Exon 5 | 108 | GAACGGCAGCTCTCCACCATGATT-ACCCAGCTGATCAGTTTACGGGAG |
| SOX6- 7 | 11p15.3 | Exon 7 | 117 | GCTCCCTGTCTGATCATAGGCTCTTT-CTGTTAGCAGGTTACGGGTACATG |
| SOX6- 8 | 11p15.3 | Exon 8 | 122 | CCGACAGGTGATAACTACCCCGTA-CAGTTCATTCCATCAACAATGGCAGCTGC |
| SOX6- 9 | 11p15.3 | Exon 9 | 133 | GGCTAAAGGGCCTAAGTGACCGTTT-TGGCAGGAATTTGGACACCTTTGAAC |
| SOX6- 10 | 11p15.3 | Exon 10 | 143 | GTCACCTGGAGCAAAGATGCCATC-AACTCCACAGCCACCAACACAGCAG |
| SOX6- 11 | 11p15.3 | Exon 11 | 138 | CAGAACCTCTTCCAGCCAGCAAA-ACCAGCCCTGTCAATCTGCCAAACT |
| SOX6- 13 | 11p15.3 | Exon 13 | 148 | GACCTTACTCGGCCAGAAGATGCA-GAGGGTGAGTGGCTTTTCTCTAGTTC |
| SOX6- 15 | 11p15.3 | Exon 15 | 100 | CTGATGAGGTCTCGGAGACAGGAGAT-GAGGCAGTTCTTTACTGTGGGGTAAGTATTCC |
| SOX6- 16 | 11p15.3 | Exon 16 | 152 | CGGTCATCCAGACACTTATGGTA-TGAAGACAGATGGCGGAAGCCTAG |
| WBSR1 | 7q11.23 | — | 89 | GGTAGCTCTCGAGAATCTAGAGGTGG-ATGGGATTTCCCGGGATGACTTC |
| RAI1 | 17p11.2 | — | 112 | GGCAAGGAAAAGTGGCCTTTTTCGTGACA-CAGAAGTGGACACATCATTCTGATCTCA GGGCTCT |
| MAPT | 17q21.31 | — | 128 | CTGGGACTTTAGGGCTAACCAGTTCTCTTTGTA-AGGACTTGTGCCTCTTGGGAGACG TCCACCCGTTTC |

Chromosomal location, *SOX6* exons, probe lengths and ligation site sequences are indicated for the *SOX6* and three control fragments.

SOX6 and *SOX9* antibodies. Sections were examined using a BX41 microscope (Olympus), and photos were taken using a DP20 digital camera (Olympus) with Cella software (Olympus).

Luciferase assay

U2OS cells were seeded in 12-well plates at a density of 160 000 cells/well. Reporter constructs were cotransfected with expression plasmids using FUGENE6 transfection reagent (Roche) according to the manufacturer's instructions and with a 3:2 FUGENE:DNA ratio. DNA included 300 ng of PRL-TK control plasmid, 1500 ng of (4XA1)pCol2Luc reporter plasmid (control and reporter plasmids were transfected in a 1:5 ratio) and 250 ng of *SHOX*, *SOX5*, *SOX6* or *SOX9* expression plasmids (pcDNA3-FLAG or pcDNA3-HA vectors). Empty expression plasmid was added, whenever necessary, to normalize DNA concentrations. Each plasmid combination was transfected in three wells. Twenty-four hours later, cells were lysed and the reporter activity was measured in triplicate using the Dual luciferase reporter assay system (Promega) according to the manufacturer's instructions. Each sample was normalized, first, with respect to the renilla luciferase activity, and then secondly, to that transfected only with the reporter plasmid. Statistical analyses were undertaken with SPSS v15.0 for Windows. We employed one-factor analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni *post hoc* test for analysing the results of luciferase assay.

SOX5 and SOX6 mutation screening

Patients. Ethical approval was obtained from the respective institutions. The cohort consisted of 37 probands with LWD or suspected LWD. All participants provided informed consent for the performed studies. Clinical details were obtained for all patients recruited into the study. Whenever possible, these included birth details, anthropometric measurement, actual height and height standard deviation scores (SDSs) according to the national standards (30), physical

examination of extremities and X-rays of the lower arm. Family histories were also documented, including parental heights. In all cases, the presence of *SHOX*/*PAR1* alterations had been excluded previously (5,9).

Peripheral blood was drawn from probands for DNA extraction. Genomic DNA was isolated by the salt precipitation method (31). The screening of point mutations, small deletions and insertions in the coding sequences and intron/exon boundaries of *SOX5* (ENST00000451604) and *SOX6* (ENST00000316399) was performed by denaturing high-performance liquid chromatography (dHPLC, Transgenomic Wave 3500HT), and subsequent sequencing of any identified heteroduplex using the BigDye Terminator V3.1 kit (Applied Biosystems). PCR conditions were as described previously (5). Primer sequences, amplicon sizes, PCR annealing temperatures and dHPLC conditions for *SOX5* and *SOX6* are available in Tables 3 and 4, respectively.

SOX5 deletion analysis was undertaken through the detection of heterozygosity of a (GA)_n dinucleotide repeat marker located ~53 kb upstream of *SOX5* exon 1 and by the detection of heterozygosity of SNPs in the *SOX5* amplicons. Analysis of the patients for the *SOX5* microsatellite marker was undertaken using the following oligonucleotides: 5'-CCGCTGCTGGAAGTG-3' and 5'-CCACCTATGATCGTCTCCAA-3'. PCR conditions were as previously described (5) and the amplicon annealing temperature was 55°C. Amplification products were separated using an ABI 3130 Sequencer.

SOX6 large deletions and duplications were studied in our cohort by observing heterozygosity of SNPs in the *SOX6* amplicons and by using a *SOX6* self-designed MLPA assay. This consisted of 11 *SOX6* probes and three control fragments (Table 5). MLPA reactions were carried out using an EK1 SALSA MLPA Kit (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) according to the manufacturer's protocol. The ratios of the test's peak areas versus those of the control samples were determined using an Excel data sheet. Normal peaks were classified as showing a ratio of 0.65–1.35, whereas deletions and duplications were classified as having a ratio <0.65 or >1.35, respectively.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the clinicians and patients who participated in the study; Dr Santiago Rodríguez de Córdoba and Dr Olga Criado-García for their help; Dr Stan Hollenberg for the pGBDU vector and the mouse cDNA library; Dr Shiro Ikewaga and Dr Toshiyuki Ikeda for the *SOX5* and *SOX6* cDNA clones, respectively; Dr Veronique Lefebvre for the (4XA1)pCol2Luc plasmid; Dr Victor Ruiz for providing the mouse growth plate samples; Dr Pascual Sanz for critical reading; and Francisca Diaz-González for technical assistance.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work was supported by the Ministerio de Innovación y Ciencia (MICINN SAF2003-02511, SAF2006-00663 to M.A.-C., S.B.-S., J.A., Á.C.-B., K.E.H.; SAF2009-08230 to V.B.-T., A.B., S.B.-S., K.E.H.). PhD studentships were awarded from the Comunidad de Madrid to M.A.-C.; CIBERER to P.Y.-C. and A.B.; MICINN (SAF2009-00663 to V.B.-T., A.B.); Research Training Fellowship from the Wellcome Trust (051419/055 to D.J.S.); and postdoctoral fellowship from CIBERER to S.B.-S.

REFERENCES

- Rao, E., Weiss, B., Fukami, M., Rump, A., Niesler, B., Mertz, A., Muroya, K., Binder, G., Kirsch, S., Winkelman, M. *et al.* (1997) Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat. Genet.*, **16**, 54–63.
- Ellison, J.W., Wardak, Z., Young, M.F., Gehron Robey, P., Laig-Webster, M. and Chiong, W. (1997) PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 1341–1347.
- Belin, V., Cusin, V., Viot, G., Girlich, D., Toutain, A., Moncla, A., Vekemans, M., Le Merrer, M., Munnich, A. and Cormier-Daire, V. (1998) SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Nat. Genet.*, **19**, 67–69.
- Shears, D.J., Vassal, H.J., Goodman, F.R., Palmer, R.W., Reardon, W., Superti-Furga, A., Scambler, P.J. and Winter, R.M. (1998) Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nat. Genet.*, **19**, 70–73.
- Benito-Sanz, S., Thomas, N.S., Huber, C., Gorbenco del Blanco, D., Aza-Carmona, M., Crolla, J.A., Maloney, V., Rappold, G., Argente, J., Campos-Barros, A. *et al.* (2005) A novel class of pseudoautosomal region 1 deletions downstream of SHOX is associated with Leri-Weill dyschondrosteosis. *Am. J. Hum. Genet.*, **77**, 533–544.
- Sabherwal, N., Bangs, F., Röth, R., Weiss, B., Jantz, K., Tiecke, E., Hinkel, G.K., Spaich, C., Hauffa, B.P., van der Kamp, H. *et al.* (2007) Long-range conserved non-coding SHOX sequences regulate expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 210–222.
- Campos-Barros, A., Benito-Sanz, S., Ross, J.L., Zinn, A.R. and Heath, K.E. (2007) Compound heterozygosity of SHOX-encompassing and downstream PAR1 deletions results in Langer mesomelic dysplasia (LMD). *Am. J. Med. Genet. A*, **143**, 933–938.
- Bertorelli, R., Capone, L., Ambrosetti, F., Garavelli, L., Variale, L., Mazza, V., Stanghellini, I., Percesepe, A. and Forabosco, A. (2007) The homozygous deletion of the 3' enhancer of the SHOX gene causes Langer mesomelic dysplasia. *Clin. Genet.*, **72**, 490–491.
- Benito-Sanz, S., del Blanco, D.G., Aza-Carmona, M., Magano, L.F., Lapunzina, P., Argente, J., Campos-Barros, A. and Heath, K.E. (2006) PAR1 deletions downstream of SHOX are the most frequent defect in a Spanish cohort of Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) probands. *Hum. Mutat.*, **27**, 1062.
- Huber, C., Rosilio, M., Munnich, A. and Cormier-Daire, V., French SHOX GeNeSiS Module. (2006) High incidence of SHOX anomalies in individuals with short stature. *J. Med. Genet.*, **43**, 735–739.
- Chen, J., Wildhardt, G., Zhong, Z., Roeth, R., Weiss, B., Steinberger, D., Decker, J., Blum, W.F. and Rappold, G.A. (2009) Enhancer mutations of the SHOX gene as a frequent cause of short stature—the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J. Med. Genet.*, **46**, 834–839.
- Cohen, P., Rogol, A.D., Deal, C.L., Saenger, P., Reiter, E.O., Ross, J.L., Chernausek, S.D., Savage, M.O. and Wit, J.M. 2007 ISS Consensus Workshop Participants. (2008) Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **93**, 4210–4217.
- Marchini, A., Häcker, B., Marttila, T., Hesse, V., Emons, J., Weiss, B., Karperien, M. and Rappold, G. (2007) BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 3081–3087.
- Clement-Jones, M., Schiller, S., Rao, E., Blaschke, R.J., Zuniga, A., Zeller, R., Robson, S.C., Binder, G., Glass, I., Strachan, T. *et al.* (2000) The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 695–702.
- Tiecke, E., Bangs, F., Blaschke, R., Farrell, E.R., Rappold, G. and Tickle, C. (2006) Expression of the short stature homeobox gene Shox is restricted by proximal and distal signals in chick limb buds and affects the length of skeletal elements. *Dev. Biol.*, **298**, 585–596.
- Marchini, A., Marttila, T., Winter, A., Caldeira, S., Malanchi, I., Blaschke, R.J., Häcker, B., Rao, E., Karperien, M., Wit, J.M. *et al.* (2004) The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J. Biol. Chem.*, **279**, 37103–37114.
- Ikeda, T., Kamekura, S., Mabuchi, A., Kou, I., Seki, S., Takato, T., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Ikegawa, S. and Chung, U.I. (2004) The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum.*, **50**, 3561–3573.
- Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., de Crombrughe, B. and Lefebvre, V. (2001) The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev. Cell.*, **1**, 277–290.
- Smits, P., Dy, P., Mitra, S. and Lefebvre, V. (2004) Sox5 and Sox6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate. *J. Cell Biol.*, **164**, 747–758.
- Rao, E., Blaschke, R.J., Marchini, A., Niesler, B., Burnett, M. and Rappold, G.A. (2001) The Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 3083–3091.
- Akiyama, H., Chaboissier, M.C., Martin, J.F., Schedl, A. and de Crombrughe, B. (2002) The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.*, **16**, 2813–2828.
- Han, Y. and Lefebvre, V. (2008) L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Mol. Cell Biol.*, **28**, 4999–5013.
- Wissmüller, S., Kosian, T., Wolf, M., Finzsch, M. and Wegner, M. (2006) The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 1735–1744.
- Lefebvre, V. (2002) Towards understanding the functions of the two highly related Sox5 and Sox6 genes. *J. Bone Miner. Metab.*, **20**, 21–30.
- Lefebvre, V., Li, P. and de Crombrughe, B. (1998) A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.*, **17**, 5718–5733.
- Liu, C.J., Zhang, Y., Xu, K., Parsons, D., Alfonso, D. and Di Cesare, P.E. (2007) Transcriptional activation of cartilage oligomeric matrix protein by

- Sox9, Sox5, and Sox6 transcription factors and CBP/p300 coactivators. *Front. Biosci.*, **12**, 3899–3910.
27. Schneider, K.U., Marchini, A., Sabherwal, N., Röth, R., Niesler, B., Marttila, T., Blaschke, R.J., Lawson, M., Domic, M. and Rappold, G. (2005) Alteration of DNA binding, dimerization, and nuclear translocation of SHOX homeodomain mutations identified in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis. *Hum. Mutat.*, **26**, 44–52.
 28. Saito, T., Ikeda, T., Nakamura, K., Chung, U.I. and Kawaguchi, H. (2007) S100A1 and S100B, transcriptional targets of SOX trio, inhibit terminal differentiation of chondrocytes. *EMBO Rep.*, **8**, 504–509.
 29. Cohen-Barak, O., Hagiwara, N., Arlt, M.F., Horton, J.P. and Brilliant, M.H. (2001) Cloning, characterization and chromosome mapping of the human SOX6 gene. *Gene*, **7**, 157–164.
 30. Sobradillo, B., Aguirre, A., Aresti, U., Bilbao, A., Fernández-Ramos, C., Lizárraga, A., Lorenzo, H., Madariaga, L., Rica, I., Ruiz, I. *et al.* (2002) Curvas y Tablas de crecimiento (Estudios Longitudinal y Transversal). *Fundación Faustino Orbeago Eizaguirre Bilbao*, 1–36, www.aepap.org/crecorbegozo.htm.
 31. Nicolaidis, N.C. and Stoeckert, C.J. Jr. (1990) A simple, efficient method for the separate isolation of RNA and DNA from the same cells. *Biotechniques*, **8**, 154–156.